

Untersuchung der Thrombingenerierung als  
prädiktiver Marker der Thromboseneigung bei  
Patienten mit positiven Screeninguntersuchungen  
auf Lupusantikoagulans

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Leonid Cuznetov

geboren am 25.11.1983 in Kischinev / Chişinău

## Gutachter

1. PD Dr. med. Klas Böer, Jena
2. HDoz. Dr. med. Wolfgang Lösche, Jena
3. Prof. Dr. med. Oliver Müller, Heidelberg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.11.2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Antiphospholipidsyndrom . . . . .	6
1.2 Richtlinien . . . . .	7
1.3 Manifestationsformen . . . . .	9
1.3.1 Pulmologie . . . . .	9
1.3.2 Kardiologie . . . . .	9
1.3.3 Neurologie . . . . .	10
1.3.4 Dermatologie . . . . .	10
1.3.5 Ophthalmologie . . . . .	10
1.3.6 Hepatologie . . . . .	10
1.3.7 Katastrophales Antiphospholipidsyndrom . . . . .	11
1.3.8 Gynäkologie und Geburtshilfe . . . . .	11
1.4 Pathophysiologie . . . . .	12
1.4.1 Lupusantikoagulans . . . . .	12
1.4.2 Anti-Phospholipid-Antikörper . . . . .	13
1.4.3 Anti-Cardiolipin-Antikörper . . . . .	14
1.4.4 Anti- $\beta_2$ -Glycoprotein I-Antikörper . . . . .	15
1.5 Etablierte diagnostische Testverfahren . . . . .	16
1.5.1 Grundlagen . . . . .	16
1.5.2 <i>Diluted Russell's Viper Venom Time</i> . . . . .	17
1.5.3 <i>Silica Clotting Time</i> . . . . .	17
1.5.4 <i>Kaolin Clotting Time</i> . . . . .	18
1.6 Thrombingenerierung . . . . .	19

<b>2</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Methodik</b>	<b>22</b>
3.1	Patientenkollektiv . . . . .	22
3.2	Proben . . . . .	24
3.2.1	Vorbereitung der Proben . . . . .	24
3.2.2	Messung der dRVVT und aPTT . . . . .	24
3.2.3	Tests auf Protein-S-, Protein-C-, Antithrombin-Mangel, Faktor-V-Leiden- und Prothrombin-Mutation . . . . .	24
3.2.4	Messung der Thrombingenerierung . . . . .	25
3.3	Reagenzien . . . . .	26
3.3.1	TECHNOTHROMBIN® TGA™ . . . . .	26
3.3.2	IL Test™ MixCon LA . . . . .	26
3.3.3	LAC Screen / Confirm HemosIL™ . . . . .	27
3.4	Methoden der statistischen Analyse . . . . .	28
3.4.1	Logistische Regressionsanalyse . . . . .	28
3.4.2	<i>Receiver Operating Characteristics Analysis</i> . . . . .	28
3.5	Gerätschaft und Software . . . . .	30
3.5.1	Messung der Thrombingenerierung . . . . .	30
3.5.2	Statistische Analyse . . . . .	30
3.5.3	Illustrations- und Textverarbeitung . . . . .	30
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
4.1	Messungenauigkeit . . . . .	31
4.2	Einfluss von $\alpha\beta_2$ GPI-AK und aCL-AK auf Thrombingenerierung . . . . .	31
4.3	Vergleich der TG-Parameter und LAC-Screen-Ratio zwischen Patienten mit und ohne Thrombose . . . . .	32
4.4	Vergleich der TG-Parameter nach Stratifizierung der Patienten nach LAC-Screen-Ratio und Thromboseanamnese . . . . .	37
4.5	Logistische Regressionsanalyse zur Detektion des erklärungsstärksten Prädiktors . . . . .	46
4.6	ROC-Analyse der TG-Parameter zur Beurteilung der Trennschärfe in Bezug auf vorangegangene Thrombose . . . . .	46

<b>5 Diskussion</b>	<b>49</b>
<b>6 Schlussfolgerungen</b>	<b>52</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>Anhang</b>	<b>I</b>
Abbildungsverzeichnis . . . . .	II
Tabellenverzeichnis . . . . .	III
Formelsammlung . . . . .	IV
Ehrenwörtliche Erklärung . . . . .	V
Votum der Ethik-Kommission . . . . .	VI
Danksagung . . . . .	VII

## Abkürzungsverzeichnis

a $\beta_2$ GPI-AK	Anti- $\beta_2$ -Glycoprotein I-Antikörper
aCL-AK	Anti-Cardiolipin-Antikörper
AK	Antikörper
APC	Aktiviertes Protein C
APC-Resistenz	Resistenz gegen das aktivierte Protein C
aPL-AK	Anti-Phospholipid-Antikörper
APS	Antiphospholipidsyndrom
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AUC	Fläche unter der Kurve (englisch: area under the curve)
AUC <sub>ROC</sub>	Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve
$\beta_2$ GPI	$\beta_2$ -Glycoprotein I
dRVVT	englisch: diluted Russell's Viper Venom Time
ELISA	Enzymgekoppeltes antikörperbasiertes Immunadsorptionsverfahren (englisch: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
IgG	Immunglobulin-G-Isotyp
IgM	Immunglobulin-M-Isotyp
KCT	englisch: Kaolin Clotting Time
KI	Konfidenzintervall
LA	Lupusantikoagulans
lyo.	Lyophilisiert
n.s.	Nicht signifikant
PT	englisch: Prothrombin Time
RC <sub>HIGH</sub>	TECHNOTHROMBIN® TGA™ Reagenz C High
RC <sub>LOW</sub>	TECHNOTHROMBIN® TGA™ Reagenz C Low
ROC-Analyse	englisch: Receiver Operating Characteristics Analysis
ROC-Kurve	Grenzwertoptimierungskurve (englisch: Receiver Operating Characteristics Analysis Curve)
SCT	englisch: Silica Clotting Time
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
TG	Thrombingenerierung

## Zusammenfassung

Das Antiphospholipidsyndrom ist durch die Anwesenheit von Antikörpern gegen Phospholipide bzw. gegen die Komplexe aus Phospholipiden und phospholipidbindenden Proteinen gekennzeichnet. Eine Klasse dieser Antikörper wird als Lupusantikoagulans bezeichnet. Diese Antikörper führen zur Verlängerung der Gerinnungszeit in vitro, jedoch zu einer Thromboseneigung in vivo. Das Thromboserisiko variiert abhängig von der Anzahl und Art der positiv ausgefallenen Lupusantikoagulans-Tests oder dem Lupusantikoagulans-Titer. Es treten jedoch nicht bei allen Patienten Rezidive auf. Die Risikoabschätzung für ein Thromboserezidiv ist notwendig, um die Patienten zu selektieren, die von einer verlängerten Antikoagulation profitieren würden.

Die Hypothese dieser Arbeit war, dass die aus der Messung der Thrombingenerierung abgeleiteten Parameter bei Patienten mit auffälligen Testergebnissen in der Lupusantikoagulans-Diagnostik verändert sind.

Es wurden retrospektiv Proben von 63 Patienten von Januar bis Dezember 2009 ausgesucht (29 Patienten mit auffälligen Ergebnissen, 34 Kontrollpatienten). Die Indikationen für die Laboruntersuchung waren vorangegangene Thrombose, eine Verlängerung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit und der systemische Lupus erythematodes in der Krankengeschichte. Die Messung der Thrombingenerierung erfolgte mit einem Fluorometer.

Die Fälle wurden in Abhängigkeit von einer Thrombose in der Vorgeschichte und den Ergebnissen der Lupusantikoagulans-Diagnostik stratifiziert. Mit dem Mann-Whitney-Wilcoxon-Test wurde die Signifikanz der Nicht-Übereinstimmung der Ergebnisverteilung der Gruppen für einzelne Parameter untersucht.

Die aus der Messung der Thrombingenerierung abgeleiteten Parameter unterschieden sich zum Teil signifikant von der Kontrollgruppe, insbesondere bei Patienten mit auffälligen Ergebnissen der Lupusantikoagulans-Diagnostik und einer Thrombose in der Anamnese.

Unter den untersuchten Parametern zeigte sich „die Fläche unter der Fluoreszenz-Zeit-Kurve“, bei Verwendung des Reagenzes mit hoher Phospholipidkonzentration, als bester Prädiktor einer vorausgegangenen Thrombose. Die Ergebnisse der Untersuchung lassen spekulieren, dass die Messung der Thrombingenerierung zusätzlich zur Screeninguntersuchung auf Lupusantikoagulans (*diluted Russell's Viper Venom Time*) eine bessere Diskriminierung zwischen Patientengruppen mit einem hohen und einem niedrigen Risiko für eine erneute Thrombose erlaubt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Antiphospholipidsyndrom

Anfang der 1950er Jahre wurde bei Patienten mit einem systemischen Lupus erythematoses eine Gerinnungsstörung beschrieben. Diese manifestierte sich in Form von verlängerten Gerinnungszeiten und einer gesteigerten Thromboseneigung. Die noch nicht identifizierten Gerinnungshemmer wurden als Lupus-Antikoagulanzen bezeichnet. Da die Betroffenen häufig eine falsch-positive Lues-Serologie aufwiesen, konnte im Verlauf ein Zusammenhang mit Antikörpern (AK) hergestellt und Cardiolipin als Prototyp von Antigenen erkannt werden (Specker 2007a).

An den pathophysiologischen Prozessen im Rahmen des Antiphospholipidsyndroms sind nicht ausschließlich nur AK gegen Phospholipide beteiligt. So gab es Vorschläge das Antiphospholipidsyndrom (APS) in das Antiphospholipid/Cofaktor-Syndrom umzubenennen (Alarcon-Segovia und Cabral 1996).

Es wird zwischen dem primären APS und dem sekundären APS unterschieden. Das primäre APS tritt unabhängig von anderen Erkrankungen auf. Das sekundäre APS tritt insbesondere bei Autoimmunerkrankungen auf. Systemischer Lupus erythematoses (SLE) ist die häufigste Grunderkrankung. Diese Unterteilung findet Beachtung im Forschungsbereich, hat jedoch keine klinischen Konsequenzen (Miyakis et al. 2006, Vianna et al. 1994). Die im Jahr 2009 erschienene Studie „*The Euro-Phospholipid project - Epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe*“ zeigte, dass das primäre APS häufiger (53%; n=1000) als das SLE-assoziierte APS oder das Lupus-artige Syndrom (42%; n=1000) vorkommt. In der Euro-Phospholipid-Kohorte wurde beobachtet, dass die Patienten mit einem SLE-assoziierten APS häufiger an Arthritis, Livedo reticularis, Thrombozytopenie und Leukopenie erkrankten, was ein Indiz für die Unterschätzung der klinischen Relevanz ist (Cervera et al. 2009a).



## 1.2 Richtlinien

Die APS-Definition besitzt einen nominalen Charakter, wonach festgelegte Kriterien in einer bestimmten Konstellation erfüllt sein müssen. Diese Klassifikationskriterien wurden 1998 in Sapporo erarbeitet und 2006 in einer internationalen Konsensuserklärung aktualisiert (Wilson et al. 1999, Miyakis et al. 2006). Sie werden in klinische und biochemische Kriterien unterteilt.

### 1. Klinische Kriterien:

#### a) Vaskuläre Thrombose:

Eine oder mehrere Episoden einer arteriellen oder venösen Thrombose oder einer Thrombose in kleinen Gefäßen in einem beliebigen Gewebe oder Organ. Die Thrombose muss bestätigt und durch objektive Kriterien validiert sein. Das bedeutet mittels bildgebender Verfahren, einer Ultraschall- oder histopathologischen Untersuchung. Histopathologisch sollte die Thrombose ohne Entzündungszeichen der Gefäßwand bestätigt sein.

oder

#### b) Schwangerschaftsmorbidität:

- i. Eine oder mehrere ungeklärte Fehlgeburten eines morphologisch unauffälligen Fötus jenseits der zehnten Gestationswoche mit einer durch Ultraschalluntersuchung oder durch direkte Untersuchung des Fötus gesicherten normalen Morphologie.

oder

- ii. Eine oder mehrere Frühgeburten eines morphologisch normalen Kindes ab der 34. Gestationswoche aufgrund einer schweren Präeklampsie oder Eklampsie nach Standarddefinitionen von *American College of Obstetricians and Gynecologists* oder einer schweren placentaren Insuffizienz.

oder

- iii. Drei oder mehrere aufeinander folgende ungeklärte, spontane Aborte vor der zehnten Gestationswoche. Mütterliche anatomische oder hormonelle Abnormalitäten sowie genetische Ursachen väterlicher- und mütterlicherseits müssen ausgeschlossen sein.

## 2. Biochemische Kriterien:

a) Lupusantikoagulans im Plasma an zwei oder mehreren Zeitpunkten mit einem Abstand von mindestens zwölf Wochen. Es muss ein Testverfahren entsprechend den Richtlinien der *International Society on Thrombosis and Haemostasis (Scientific Subcommittee on Lupus Anticoagulant / Phospholipid-Dependent Antibodies)* (Wisløff et al. 2002, Quehenberger und Wagner 2005) in folgender Reihenfolge verwendet werden:

- i. Verlängerte phospholipidabhängige Gerinnungszeit in einem Globaltest. Zum Beispiel in der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT), *Kaolin Clotting Time* (KCT), *diluted Russell's Viper Venom Time* (dRVVT), verdünnter Prothrombinzeit oder *Textarin Time*.
- ii. Keine Korrektur der verlängerten Gerinnungszeit in den genannten Globaltests durch Mischung des Patientenplasmas mit einem plättchenarmen Normalplasma, sprich ein negativer Plasmaaustauschversuch.
- iii. Verkürzung oder Korrektur der verlängerten Gerinnungszeit in den genannten Globaltests durch Zusatz von Phospholipiden im Überschuss.

oder

b) Anti-Cardiolipin-Antikörper (aCL-AK) vom Immunglobulin-G-Isotyp (IgG) und/oder Immunglobulin-M-Isotyp (IgM) mit hohen oder mittleren Titern ( $>40$  G-/M-Phospholipid-Einheiten oder oberhalb des 99. Perzentils) im Blut, an zwei oder mehreren Zeitpunkten mit einem Abstand von mindestens zwölf Wochen. Als Testverfahren muss ein standardisiertes enzymgekoppeltes antikörperbasiertes Immunadsorptionsverfahren (ELISA) für  $\beta_2$ -Glycoprotein I-abhängige aCL-AK verwendet werden (Wong 2004).

oder

c) Anti- $\beta_2$ -Glycoprotein I-Antikörper ( $\alpha\beta_2$ GPI-AK) vom Immunglobulin-G-Isotyp und/oder Immunglobulin-M-Isotyp im Serum oder Plasma an zwei oder mehreren Zeitpunkten mit einem Abstand von mindestens zwölf Wochen mit einem Titer oberhalb des 99. Perzentils, gemessen durch einen nach empfohlenen Verfahren standardisierten ELISA (Reber et al. 2004).

Die APS-Diagnose muss erwogen werden, wenn jeweils mindestens ein klinisches und ein biochemisches Kriterium erfüllt sind. Der Ausschluss anderer Koagulopathien als Kriterium ist in der aktualisierten Version nicht mehr vorhanden (Miyakis et al. 2006).

## 1.3 Manifestationsformen

Die häufigsten Manifestationsformen des Antiphospholipidsyndroms sind arterielle oder venöse Thrombosen. Die Gefäßverschlüsse führen durch Hypoxie zur Schädigung des zu versorgenden Gewebes. Die Symptome und die Zeit zwischen den einzelnen Ereignissen, auch bei den gleichen Patienten, variieren sehr stark. Dies erschwert die Früherkennung. Zusätzliche Schwierigkeiten bereitet die Frage, ob beim sekundären APS die Symptome ursächlich auf die Grunderkrankung oder beim primären APS auf die Begleiterkrankungen zu beziehen sind.

### 1.3.1 Pulmologie

Die pulmonale Thromboembolie in Verbindung mit einer tiefen Venenthrombose ist die am häufigsten berichtete Manifestation des APS. Zum Spektrum der Lungenerkrankungen bei APS-Patienten gehören Lungenembolien und -infarkte, pulmonale Hypertonie, Atemnotsyndrom des Erwachsenen, intraalveoläre Blutungen, pulmonale Kapillaritis sowie primäre Thrombosen sowohl der großen als auch der kleinen Lungengefäße. Pulmonale Manifestationen bei APS sind ernste Komplikationen mit hoher Sterblichkeit (Stojanovich 2006). Pulmonale Hypertonie im Rahmen des Antiphospholipidsyndroms endet in der Regel tödlich (Espinosa et al. 2002).

### 1.3.2 Kardiologie

Das Herz gehört zu den durch das APS am häufigsten betroffenen Organen. Die Schäden zeigen sich als Klappendysfunktionen, koronare Verschlüsse thrombotischer und atherosklerotischer Natur und linksventrikuläre Hypertrophie (Tenedios et al. 2005). Bei 82% der Patienten (n=40) mit einem primären APS zeigt sich eine kardiale Beteiligung. Unter den Patienten mit einem aCL-AK-Titer  $\leq 40$  G-Phospholipid-Einheiten waren das 71% (17/24), während die Betroffenenzahl mit einem aCL-AK-Titer  $>40$  G-Phospholipid-Einheiten 100% (16/16) betrug (Turiel et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem hohen aCL-AK-Titer und erneuten Ereignissen mit kardialer Beteiligung besteht (Turiel et al. 2005).

Eine weitere Untersuchung zeigte, dass bei 83,8% (26/31) der Patienten mit einem primären APS funktionelle und strukturelle Klappenfehler zu finden sind. Hierbei handelte es sich überwiegend um Mitralklappenfehler (Erdogan et al. 2005). Andererseits konnte gezeigt werden, dass Herzklappenfehler bei SLE unabhängig von der Anwesenheit (77%, 17/22) oder Abwesenheit (72%, 23/32) der Anti-Phospholipid-Antikörper vorkommen. Daher sind die Anti-Phospholipid-Antikörper (aPL-AK) wahrscheinlich nicht der primäre pathogenetische Faktor hierfür (Roldan et al. 1992).

### **1.3.3 Neurologie**

Es wird ein Zusammenhang mit Schlaganfall, Krampfanfällen, Kopfschmerzen und Migräne vermutet (Rodrigues et al. 2010). Gleichzeitig existieren Studien die keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Migräne und Lupusantikoagulans bzw. Anti-Cardiolipin-AK feststellen konnten (Montalban et al. 1992). Alarcon-Segovia et al. untersuchten eine Gruppe von 500 Patienten und konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen aCL-AK und Migräne, Krämpfen oder transitorischen ischämischen Attacken aufzeigen (Alarcon-Segovia et al. 1989).

### **1.3.4 Dermatologie**

Eine retrospektive Untersuchung von 295 Patienten zeigte, dass bei 41% der Patienten eine kutane Manifestation das erste Krankheitsanzeichen war. Häufig tritt bei APS-Patienten mit dermatologischer Beteiligung ein Multiorganbefall auf (Alegre et al. 1989). Ulzerationen, Fingergangrän, oberflächliche Venenthrombose, thrombozytopenische Purpura, Pseudovaskulitis und ausgedehnte Hautnekrose sind mögliche Manifestationen (Asherson et al. 2006). Die häufigste Hautläsion ist Livedo reticularis (25,5%; n=200) (Frances et al. 2005).

### **1.3.5 Ophthalmologie**

Die häufigsten ophthalmologischen Komplikationen im Rahmen eines Antiphospholipidsyndroms sind Verschlüsse der retinalen Arterien und Venen, vor allem bei Patienten unter 50 Jahren. Bei rezidivierenden Ereignissen ist der Verdacht auf APS naheliegend (Suvajac et al. 2007). Rehak et al. empfehlen ein APS-Screening für alle Patienten mit retinalen venösen Verschlüssen und im Falle eines APS die Durchführung einer Antikoagulation (Rehak et al. 2009).

### **1.3.6 Hepatologie**

Im Hinblick auf abdominelle Manifestationen, die mit APS assoziiert sind, wurde am häufigsten von einer Leberbeteiligung berichtet. Im Einzelnen sind das Budd-Chiari-Syndrom, Leberventhromboembolie, Verschluss der kleinen Lebervenen, noduläre regenerative Hyperplasie, Leberinfarkt, Leberzirrhose, portaler Hochdruck, autoimmune Hepatitis und biliäre Zirrhose. Akuter Intestinalinfarkt, Angina intestinalis und Darmblutungen erweitern neben vereinzelt Fällen von Milzinfarkt und akuter Pankreatitis das Spektrum (Uthman und Khamashta 2007).

### **1.3.7 Katastrophales Antiphospholipidsyndrom**

In weniger als einem Prozent der Fälle (n=1000) nimmt das APS einen fulminanten Verlauf an. Die Patienten mit dem sogenannten katastrophalen Antiphospholipidsyndrom entwickeln innerhalb einer sehr kurzen Zeit eine multiple Organbeteiligung (Cervera et al. 2002, Cervera et al. 2009b). Trotz der Seltenheit zwingt die potenzielle Tödlichkeit dieser Verlaufsform dem katastrophalen Antiphospholipidsyndrom eine besondere Rolle im klinischen Alltag zuzugestehen. Im Jahr 2000 wurde von dem Europäischen Forum für Anti-Phospholipid-Antikörper ein internationales Register von Patienten mit katastrophalen Antiphospholipidsyndrom angelegt. Die Analyse der Daten der ersten 280 ins Register aufgenommenen Patienten zeigte, dass 72% davon weiblich sind. Etwa 46% leiden am primären APS und 40% am systemischen Lupus erythematoses. In 46% der Fälle tritt das katastrophale APS ohne vorausgegangene Thrombose auf. Die Ausprägung des katastrophalen Antiphospholipidsyndroms hängt vor allem von den Organen, in denen sich die Thrombosen ereignen, deren Ausmaß und von der Ausbildung des systemischen inflammatorischen Response-Syndroms ab (Cervera et al. 2010).

### **1.3.8 Gynäkologie und Geburtshilfe**

Eine immense Bedeutung gewinnt das Antiphospholipidsyndrom im Rahmen der Geburtshilfe. Das APS ist eine der Hauptursachen von Schwangerschaftskomplikationen, wie Frühgeburtlichkeit, wiederholte Fehlgeburten, geringes Geburtsgewicht, fetale Wachstumsretardierung, Präeklampsie, mütterliche Thromboembolie und Unfruchtbarkeit (Ruiz-Irastorza und Khamashta 2006, Tincani et al. 2008, Mitchell et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass das Lupusantikoagulans eine starke Assoziation mit rezidivierenden Aborten vor der 24. Schwangerschaftswoche hat und dass die aCL-AK in einem deutlichen Zusammenhang mit rezidivierenden Aborten vor der 24. Schwangerschaftswoche stehen. Andererseits ließ sich hierbei keine äquivalente Beziehung zwischen jeglichen Formen der rezidivierenden Aborte und  $\alpha\beta_2$ GPI-AK nachweisen (Levy et al. 2010).

## 1.4 Pathophysiologie

### 1.4.1 Lupusantikoagulans

1952 beschrieben Conley und Hartmann bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) eine Verlängerung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit. Später wurde der Begriff Lupusantikoagulans geprägt. Die entsprechenden Lupus-Antikoagulanzen sind ein Gemisch aus Antikörpern, die mit unterschiedlichen anionischen Phospholipiden und deren Proteinkomplexen reagieren (Quehenberger und Wagner 2005). Es handelt sich jedoch viel mehr um ein gerinnungsserologisches Phänomen als um eine Gruppe von Substanzen.

Aus biochemischer Sicht zeigen sich eine Verlängerung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit in Verbindung mit einem negativen Plasmaaustauschversuch und eine Normalisierung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit durch die Zugabe von Phospholipiden. Die scheinbar paradoxe Verlängerung der Gerinnungszeit in vitro angesichts der klinischen Thromboseneigung ist durch die in vivo praktisch unausschöpfbare Menge an Phospholipiden erklärlich, die neben der Neusynthese auch aus sämtlichen Zellabbauvorgängen freigesetzt werden. Bei einer ausreichenden Konzentration der entsprechenden Antikörper kommt es bei phospholipidabhängigen Gerinnungstests zur Konkurrenz um die vorhandenen Phospholipide zwischen den Antikörpern sowie den Gerinnungsfaktoren und Cofaktoren, sodass für die Aktivierung der Gerinnungskaskade nur eine begrenzte Menge an Phospholipiden zur Verfügung steht (Specker 2007a).

Die Testung auf Lupusantikoagulans ist somit ein Verfahren zum indirekten Nachweis von Anti-Phospholipid-Antikörpern. Aufgrund der enormen Diversität und Epitopspezifität umfasst dieses gerinnungsserologische Phänomen jedoch nicht alle APS-relevanten Antikörper.

Im Einzelnen ließ sich ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von  $\beta_2$ -Glycoprotein I-abhängigem Lupusantikoagulans und einem hohen Thromboserisiko in einer Studie mit 336 Patienten postulieren (Swadzba et al. 2011). Das Lupusantikoagulans lässt sich jedoch auch bei bis zu 8% der gesunden Probanden (n=499) nachweisen (Shi et al. 1990).

### 1.4.2 Anti-Phospholipid-Antikörper

Die Anti-Phospholipid-Antikörper (aPL-AK), genauer die Antikörper gegen Phospholipide und phospholipidbindende Proteine, bilden eine große und heterogene Gruppe. Nur wenige wurden identifiziert und intensiv untersucht. Horstman et al. unternahmen eine Unterteilung der Antigene in sechs Gruppen (Horstman et al. 2009). Siehe hierzu Tabelle 1.

Tabelle 1: Unterteilung der Antigene nach Horstman et al.

1. Etablierte und am besten untersuchte	$\beta_2$ -Glycoprotein I, Prothrombin, Protein C, Protein S, Annexin V
2. Akzeptierte, aber weniger untersuchte	Annexin 2, Antithrombin III, Faktor FVII/FVIIa, Kininogene, Komplement C4, Komplement Faktor H, Thrombin
3. Reine Phospholipide	Cardiolipin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, oxidiertes Cardiolipin, oxidierte Lipoproteine niederer Dichte
4. Oft oder gelegentlich erwähnte	Plasmin, Gewebefaktor, gewebespezifischer Plasminogenaktivator, plättchenaktivierender Faktor, <i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i> , <i>Cluster of Differentiation 40/40L (CD40/40L)</i>
5. Kandidaten	Thrombomodulin, Phospholipase A2, Endothelzell-Protein-C-Rezeptor, <i>Cluster of Differentiation 36 (CD36)</i>
6. Implizit nach Definition	Faktoren VIII, X, XI, XII

Nach den Klassifikationskriterien reicht der alleinige Antikörpernachweis für eine Diagnose nicht aus. Die Präsenz der aPL-AK im Rahmen anderer Erkrankungen ist einer der Gründe. Loizou et al. untersuchten exemplarisch die Titer-Höhe von Anti-Cardiolipin-Antikörpern,  $\beta_2$ -Glycoprotein I und Anti-Prothrombin-AK bei schwarzen süd-afrikanischen Patienten mit unterschiedlichen infektiösen Erkrankungen und registrierten erhöhte Werte bei Patienten mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (entsprechend bei 7%, 6%, 43%; n=100), mit Lepra (entsprechend bei 29%, 89%, 21%; n=112), mit Syphilis (entsprechend bei 8%, 8%, 28%; n=25) und mit Malaria (entsprechend bei 12%, 8%, 28%; n=25) (Loizou et al. 2003). Ein anderer Grund ist das Vorkommen der Anti-Phospholipid-Antikörper bei gesunden Patienten (Shi et al. 1990, Vila et al. 1994).

Das Antiphospholipidsyndrom lässt sich auf unterschiedlichen Wegen tierexperimentell auslösen. Unter anderem durch Immunisierung der Mäuse mit dem humanen  $\beta_2$ -Glycoprotein I ( $\beta_2$ GPI), Cardiolipin und auch mit aus Patienten isolierten humanen aPL-AK (Gharavi et al. 1987, Blank et al. 1994).

### 1.4.3 Anti-Cardiolipin-Antikörper

Der Nachweis von Anti-Cardiolipin-Antikörpern (aCL-AK) durch einen ELISA-Test ermöglicht die Diagnose APS bei Patienten mit entsprechenden Symptomen auch bei einem fehlenden Lupusantikoagulans-Nachweis (Wisløff et al. 2002). Eine Anti-Cardiolipin-Reaktivität ist jedoch nicht obligat mit einem Lupusantikoagulans (LA) vergesellschaftet. Das Lupusantikoagulans kommt auch ohne jegliche Anti-Cardiolipin-Reaktivität vor (McNeil et al. 1989, Landenberg et al. 2001). Die Anti-Cardiolipin-Antikörper vom IgG-Isotyp kommen bei 6,5% und vom IgM-Isotyp bei 9,4% der gesunden Probanden vor (n=552) (Vila et al. 1994).

Bei APS-Patienten finden sich am häufigsten Anti-Cardiolipin-Antikörper ausschließlich vom IgG-Isotyp (43,6%; n=1000). In absteigender Häufigkeit folgt dem Befund ein gleichzeitiger Nachweis der aCL-AK vom IgG- und IgM-Isotyp (32,1%; n=1000) und das Vorkommen der aCL-AK nur vom IgM-Isotyp (12,2%; n=1000) ist vergleichsweise selten (Cervera et al. 2002). Patienten mit dem katastrophalen Antiphospholipidsyndrom weisen aCL-AK vom IgG- und IgM-Isotyp jeweils in 83% und 38% der Fälle (n=280) auf (Cervera et al. 2009b).

Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte aCL-AK-Konzentrationen als ein Epiphänomen von Malignomen auftreten und dass Personen mit grenzwertigen Ergebnissen eine Gesamtsterblichkeit ähnlich der von Patienten ohne aCL-AK zeigen, was auf eine vergleichbare Mortalität hinweist. Im Gegensatz zu früheren Studien ließ sich hierbei die Anwesenheit von Anti-Cardiolipin-Antikörpern nicht als ein Risikofaktor für arterielle und venöse Thrombosen postulieren (Endler et al. 2006).

Die infektionsinduzierten Anti-Cardiolipin-Antikörper lassen sich von solchen unterscheiden, die mit Autoimmunerkrankungen assoziiert sind. Die infektionsinduzierten aCL-AK binden in der Regel unabhängig von  $\beta_2$ GPI an Cardiolipin (Forastiero et al. 1996, Hunt et al. 1992). Hierbei sind diese  $\beta_2$ GPI-unabhängige aCL-AK nicht mit einem Thromboserisiko assoziiert (Hassell et al. 1994, Landenberg et al. 2001).

In Fällen der medikamentösen Induktion werden häufig transient niedrigtitrige Anti-Cardiolipin-Antikörper vom IgM-Isotyp beobachtet, die vorwiegend nicht mit thrombotischen Ereignissen einhergehen. Die Entwicklung eines Antiphospholipidsyndroms ist hierbei selten (Landenberg et al. 2001).



#### 1.4.4 Anti- $\beta_2$ -Glycoprotein I-Antikörper

Das  $\beta_2$ -Glycoprotein I ( $\beta_2$ GPI), auch Apolipoprotein-H genannt, besteht aus 326 Aminosäuren, die in fünf homologen Domänen angeordnet sind. Produziert wird es in der Leber, Endothelzellen, Monozyten und wahrscheinlich in Lymphozyten, Neuronen und Astrozyten (Day et al. 1992, Caronti et al. 1999, Conti et al. 2003). Das  $\beta_2$ GPI bindet an negativ geladene Moleküle wie Heparin, Desoxyribonukleinsäure und auch an apoptotische Zellen, Thrombozyten und Endothelzellen. Da mehrere negativ geladene Moleküle den intrinsischen Gerinnungsweg auslösen können, wird dem  $\beta_2$ GPI die Funktion eines natürlichen Gerinnungshemmers zugeschrieben (Matsuura et al. 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass die  $\beta_2$ GPI-Expression auf Monozyten bei Patienten mit SLE und APS im Vergleich zu gesunden Spendern erhöht ist und mit der Gewebefaktor-Expression korreliert (Conti et al. 2003). Die Stimulation der peripheren mononukleären Zellen mit  $\beta_2$ GPI induziert eine beträchtliche dosisabhängige Expression des monozytären Gewebefaktors und erfordert  $CD4^+$ -T-Lymphozyten und Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II-Moleküle. Als hypothetisches Ergebnis einer chronischen Stimulation von  $\beta_2$ GPI-spezifischen autoreaktiven T-Lymphozyten kann sich daraus eine anhaltend hohe Expression des monozytären Gewebefaktors ergeben. Dies würde zu einer prothrombotischen Diathese führen und eine Thromboseneigung erklären (Visvanathan et al. 2000).

Die Bindung von  $\alpha\beta_2$ GPI-AK erhöht die Affinität von  $\beta_2$ GPI zu negativ geladenen Phospholipiden etwa um das Hundertfache. Die Erhöhung der  $\beta_2$ GPI-Affinität kann seine physiologische Funktion ändern oder die Bindung an andere phospholipidbindende Proteine hemmen (Matsuura et al. 2010). Die Aufhebung der gerinnungshemmenden Wirkung von  $\beta_2$ GPI wäre eine weitere Erklärung der Thromboseneigung.

Die Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern zeigen, dass die Wirkung von  $\alpha\beta_2$ GPI-AK im Wesentlichen von der Epitopspezifität abhängt. Gegen die dritte und die vierte Domäne gerichtete monoklonale  $\alpha\beta_2$ GPI-AK führen zur Verlängerung der Gerinnungszeit im dRVVT-Test. Diese gerinnungshemmende Wirkung wird bei einem Überschuss von Phospholipiden aufgehoben und ähnelt somit der Lupusantikoagulans-Aktivität. Gegen die fünfte Domäne und gegen die carboxyterminale Region der vierten Domäne gerichtete monoklonale  $\alpha\beta_2$ GPI-AK zeigen keine LA-ähnliche Aktivität. Monoklonale  $\alpha\beta_2$ GPI-AK mit LA-ähnlicher Aktivität, nicht aber diejenigen ohne diesen Effekt, verbessern die Bindung von  $\beta_2$ GPI an Phospholipide. Im Gegensatz zum Fab-Fragment, verbessert das  $F(ab')_2$ -Fragment der monoklonalen  $\alpha\beta_2$ GPI-Antikörper die LA-Aktivität und die Bindung von  $\beta_2$ GPI an Phospholipide. Dies deutet darauf hin, dass  $\alpha\beta_2$ GPI-AK die Bildung von multiplen  $\beta_2$ GPI-Komplexen auf der Oberfläche der Phospholipide induzieren kann (Takeya et al. 1997).

## 1.5 Etablierte diagnostische Testverfahren

### 1.5.1 Grundlagen

Zur Diagnostik des Antiphospholipidsyndroms gehören klinische und biochemische Untersuchungen. Diese Arbeit beschränkt sich auf die biochemischen Aspekte. Hierunter fallen die Untersuchungen auf das Vorliegen von  $\alpha\beta_2$ GPI-AK, von  $\beta_2$ GPI-abhängigen aCL-AK und auf das Lupusantikoagulans.

Das gerinnungsserologische Phänomen - Lupusantikoagulans umfasst:

- eine verlängerte phospholipidabhängige Gerinnungszeit in einem Globaltest;
- einen negativen Plasmaaustauschversuch;
- eine Korrektur der verlängerten Gerinnungszeit durch den Zusatz von Phospholipiden im Überschuss.

Bei dem Plasmaaustauschversuch wird nach der Mischung von Normal- und Patientenplasma in verschiedenen Verdünnungen die aktivierte partielle Thromboplastinzeit gemessen. Falls die Verlängerung der Gerinnungszeit auf einen Mangel der Gerinnungsfaktoren zurückzuführen ist, wird ein Plasmaaustausch zur Normalisierung der Gerinnungszeit durchgeführt. Ist ein Lupusantikoagulans vorhanden, wird die pathologische aPTT-Verlängerung durch den Normalplasma-Überschuss nicht normalisiert (Mohren et al. 2004).

Im Unterschied zum Quick-Wert, auch *Prothrombin Time* (PT) oder Thromboplastinzeit genannt, wird bei der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) auf den Gewebefaktor verzichtet. Um die Aktivierung des Faktors XII in vitro zu optimieren, enthält das Reagenz zusätzlich einen Oberflächenaktivator wie Kaolin, Celit, Kieselsäure, Kieselgur oder Ellagsäure. Zu Beurteilung wird ein Quotient aus den normalisierten aPTT-Messungen mit lupusempfindlicher und lupusunempfindlicher aPTT gebildet. Das Verhältnis aus diesen Quotienten erlaubt eine Beurteilung. Die entsprechenden Formeln sind am Beispiel von MixCon LA im Anhang dargestellt. Siehe hierzu Formelsammlung (Formeln 1 bis 3).

### 1.5.2 *Diluted Russell's Viper Venom Time*

Im Test namens *diluted Russell's Viper Venom Time* (dRVVT) wird das partielle Thromboplastin (eine Phospholipidkomponente ohne Gewebefaktor) und das gereinigte Gift der Kettenviper (*Daboia russelii*) verwendet. Siehe hierzu Tabelle 2. Das Schlangengift aktiviert direkt den Faktor X. Dadurch hat ein möglicher Faktorenmangel keine Auswirkungen auf das Testergebnis.

Im phospholipidarmen Screening-Reagenz reagieren die Anti-Phospholipid-Antikörper mit den zugesetzten Phospholipiden, wodurch diese in einem verringerten Maß für die Gerinnung verfügbar sind. Dies führt zur Verlängerung der Gerinnungszeit. Das Reagenz für den Bestätigungstest ist phospholipidreich, sodass die aPL-AK in einem größeren Ausmaß an zugesetzte Phospholipide binden und dadurch den Gerinnungsvorgang in einem geringeren Ausmaß beeinflussen. Falls hierbei, im Vergleich zur Screening-Untersuchung, eine relevante Verkürzung der Gerinnungszeit erreicht werden kann, gilt der Nachweis von Lupusantikoagulans und somit indirekt von aPL-AK als gelungen (Thiagarajan et al. 1986, Tripodi 2007, Triplett 2000). Die Formeln zur Beurteilung des Ergebnisses sind im Anhang dargestellt. Siehe hierzu Formelsammlung (Formeln 4 bis 6). Die biologische Variabilität des Schlangengiftes scheint ungünstig zu sein. Derzeit gibt es Bestrebungen ein besser geeignetes Schlangengift zu identifizieren und durch rekombinante Herstellung eine bessere Standardisierung zu ermöglichen (Lövgren 2013, Speijer et al. 1986).

### 1.5.3 *Silica Clotting Time*

Bei der Testung auf *Silica Clotting Time* (SCT) wird ebenfalls eine Phospholipidkomponente ohne Gewebefaktor verwendet. Siehe hierzu Tabelle 2. Durch den Einsatz der Kieselsäuresuspension wirken sich ein möglicher Faktor-VII-Mangel oder Faktor-VII-Antikörper nicht auf den Testablauf aus (Chantarangkul et al. 1992).

Bei der Verwendung des phospholipidarmen Screening-Reagenzes zeigt sich eine verlängerte Gerinnungszeit. Das Reagenz für den Bestätigungstest ist phospholipidreich, wodurch die Lupus-Antikoagulanzen neutralisiert werden und es zu einer Verkürzung der Zeit kommt. Zur Beurteilung wird jeweils für den Suchtest und den Bestätigungstest eine Ratio ausgerechnet. Anschließend wird aus dem Verhältnis von Screeningtest-Ratio zur Bestätigungstest-Ratio die normalisierte SCT-Ratio abgeleitet, die der Beurteilung des Testergebnisses dient. Siehe hierzu Formelsammlung (Formeln 7 bis 9).

Durch den Zusatz von Polybren kann Heparin neutralisiert werden und der Einfluss von Warfarin kann durch die Berechnung der normalisierten SCT-Ratio berücksichtigt werden (Tripodi et al. 2001).

### 1.5.4 Kaolin Clotting Time

Im Test namens *Kaolin Clotting Time* (KCT) stehen der Gerinnungsreaktion nur die Phospholipide aus dem Patientenplasma zur Verfügung. Als Oberflächenaktivator fungiert Kaolin. Siehe hierzu Tabelle 2. Der Test gilt als sehr sensitiv, jedoch relativ unspezifisch, da unterschiedliche Inhibitoren die Ergebnisse beeinflussen (Gressner und Arndt 2005).

Die Lupus-Antikoagulanzen im Untersuchungsmaterial führen zur Verlängerung der Gerinnungszeit. Zur Bestätigung wird der Test mit Normalplasma und nach Mischung von Patientenplasma mit Normalplasma wiederholt. Die Auswertung erfolgt durch die Berechnung des Rosner-Index. Siehe hierzu Formelsammlung (Formel 10).

Die Diskriminierung zwischen einem spezifischen Faktorenhemmer und Lupusantikoagulant kann mittels eines Verdünnungstests erfolgen. Im Falle der Anwesenheit von Lupus-Antikoagulanzen erfolgt durch die Verdünnung der Anti-Phospholipid-Antikörper eine Normalisierung der aPTT, während diese im Falle eines Faktorenhemmers unverändert pathologisch bleibt (Mohren et al. 2004).

Tabelle 2: Vergleichende Übersicht ausgewählter Gerinnungstests (Wisløff et al. 2002, Quehenberger und Wagner 2005, Luxembourg et al. 2007, Barthels 2008).

<b>Test</b>	<b>Zugabe von Phospholipiden</b>	<b>Zugabe von Gewebefaktor</b>	<b>Zugabe von Aktivator</b>	<b>aktivierte Faktoren</b>
<b>PT</b>	Ja	Ja	Nein	Faktoren IX und X
<b>aPTT</b>	Ja	Nein	Ellagsäure, Celit, Kaolin, Kieselgur etc.	Faktor XII
<b>SCT</b>	Ja	Nein	Kieselsäuresuspension	Faktor XII
<b>dRVVT</b>	Ja	Nein	Gift der Kettenviper	Faktor X
<b>KCT</b>	Nein	Nein	Kaolin	Faktor XII

## 1.6 Thrombingenerierung

„Unter In-Vitro-Bedingungen ist die Aktivierung von etwa 2-5% des im Plasma vorliegenden Prothrombins ausreichend, um eine messbare Fibrinbildung zu induzieren. Deswegen können mit koagulometrischen Testverfahren nur bis zum Erreichen dieses Schwellenwertes Aussagen über die Thrombinbildung gemacht werden. Das Ziel der Messung der Thrombingenerierung ist es, die Thrombinbildung quantitativ über den Zeitpunkt der Fibrinbildung hinaus zu erfassen (Pötzsch und Madlener 2010).“

Die Bestimmung der Zeit von der Aktivierung bis zum prädefinierten Ende der Gerinnungskaskade in vitro erlaubt keine Schlussfolgerungen über die Dynamik einzelner Vorgänge. Dies erfordert eine kontinuierliche Messung.

Die Thrombingenerierung (TG) basiert auf der Bestimmung der Thrombinkonzentration mittels eines fluorogenen Peptidsubstrates, die die Unterbrechung der Gerinnung zur anschließenden Messung entbehrlich macht. Zur Aktivierung der Gerinnungskaskade wird der Gewebefaktor und eine Phospholipidkomponente verwendet. Der während der Gerinnungsreaktion entstehende Prothrombinaktivator-Komplex fördert die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin. Dieser spaltet das fluorogene Peptidsubstrat, was zur Änderung der Fluoreszenz führt.

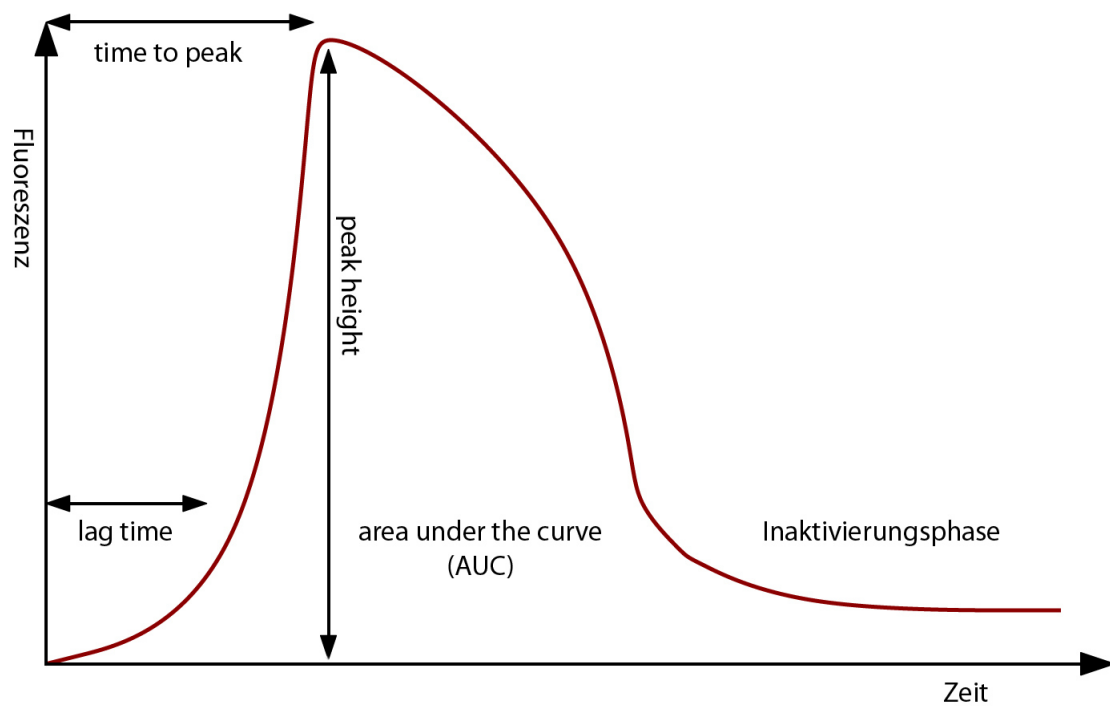
Durch kontinuierliche Bestimmung während des Gerinnungsvorganges kann die gemessene Fluoreszenz gegen die Zeit aufgetragen werden. Siehe hierzu Abbildung 1. Folgende Parameter können hierbei abgeleitet werden:

- Die Verzögerungszeit - *lag time*.
- Die Zeit bis zum Erreichen des Maximums - *time to peak*.
- Die maximale Höhe der Thrombinkonzentration - *peak height*.
- Die Fläche unter der Kurve - *area under the curve* (AUC).

Diese werden im Rahmen dieser Arbeit als TG-Parameter zusammengefasst.

Seit einigen Jahren erfährt die Messung der Thrombingenerierung zunehmende Aufmerksamkeit. Obwohl eine Standardisierung des Verfahrens fehlt, wurde das Verfahren bereits bei einer Vielzahl von Patienten untersucht (Berntorp und Salvagno 2008).

Das Verfahren wurde in Bezug auf Prädiktion von rezidivierenden venösen Thromboembolien (Eichinger et al. 2008, Hron et al. 2006), als Screening-Instrument für thrombophile Faktoren (Hezard et al. 2006), im Hinblick auf die Risikobewertung der Thromboseneigung bei Patienten mit Resistenz gegen das aktivierte Protein C (APC-Resistenz) (Tans et al. 2003) und zum Nachweis von Antiphospholipidsyndrom (Devereese et al. 2009, Sheng et al. 2001) untersucht. Nichtsdestotrotz bleibt die gegenwärtige Studienlage zum diagnostischen Einsatz der Messung der Thrombingenerierung widersprüchlich und weitgehend lückenhaft.



Die Intensität der Fluoreszenzstrahlung (rot) ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Parameter *lag time*, *time to peak* und *peak height* sind mit Pfeilen markiert. *Area under the curve* bezieht sich auf die Fläche unter der Kurve.

Abbildung 1: Aus der Messung der Thrombingenerierung abgeleitete Parameter (TG-Parameter).

## 2 Ziele der Arbeit

Abhängig von der Anzahl und der Art der positiv ausgefallenen Lupusantikoagulans-Tests, sowie von der Höhe des Lupusantikoagulans-Titers variiert das Risiko der Entwicklung von Thrombosen (Devreese et al. 2011, Galli et al. 2003, Galli 2004). Oft werden Lupusantikoagulans-Tests nach einem thrombotischen Ereignis durchgeführt und Patienten erhalten gegebenenfalls eine Antikoagulation (Ruiz-Irastorza et al. 2011, Ruiz-Irastorza et al. 2007). Die Antikoagulation erfolgt mindestens sechs Monate bis lebenslang. Doch trotz des hohen Risikos, treten nicht bei allen Patienten Rezidive auf (Specker 2007b, Schulman et al. 1998, Akimoto et al. 2005).

Es besteht eine dringende Notwendigkeit einer Verbesserung der Laboratoriumsdiagnostik im Hinblick auf die Risikoprädiktion. Die Entwicklung der Messung der Thrombingenerierung ermöglicht es die Thrombinbildung quantitativ über den Zeitpunkt der Fibrinbildung hinaus zu erfassen. Dies erweckt die Hoffnung die Messung der Thrombingenerierung erfolgreich im klinischen Alltag einzusetzen um das Risiko eines Thromboserezidivs bei LA-positiven Patienten besser abschätzen zu können.

Die Grundhypothese dieser Arbeit war, dass die Parameter der Thrombingenerierung bei Patienten mit auffälligen Testergebnissen in der Lupusantikoagulans-Diagnostik verändert sind. Des Weiteren wurde untersucht, ob die einzelnen Parameter der Thrombingenerierung mit früheren thromboembolischen Ereignissen korrelieren.

## 3 Methodik

### 3.1 Patientenkollektiv

Aus dem Lupusantikoagulans-Testprogramm des Zentrallabors des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurden, retrospektiv von Januar bis Dezember 2009, Proben von 63 Patienten ausgesucht. Wenn ein Patient mehrmals während der Studiendauer getestet wurde, wurde nur die erste Probe in die Studie eingeschlossen. Ein ausreichendes Probenvolumen und eine zur Verfügung stehende Krankengeschichte waren weitere Voraussetzungen.

Da eine verlängerte Gerinnungszeit durch gerinnungshemmende Medikamente verursacht werden kann, wurden die Proben mit einem Quick-Wert unterhalb des Referenzbereiches (70%) nicht berücksichtigt.

Alle Proben mit einer abnormen LAC-Screen-Ratio (dRVVT-Suchtest) während der Testperiode wurden in die Studie aufgenommen, insgesamt 29 Proben. Von den Proben, die in beiden Screening-Tests (dRVVT und aPTT) während der Studiendauer negative Ergebnisse lieferten, wurden nicht alle, sondern 34 Proben der Kontrollgruppe zugeordnet. Siehe hierzu Abbildung 2.

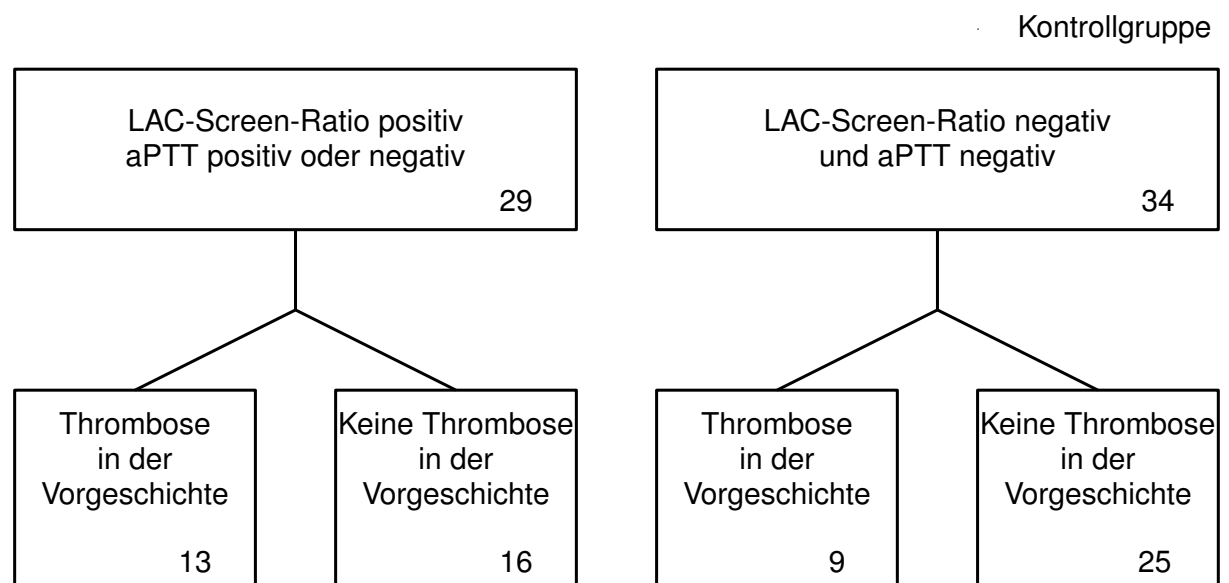


Abbildung 2: Auswahlverfahren von Patientenproben, die in die Untersuchung aufgenommen wurden.



Die Indikationen für die Laboruntersuchung waren vorangegangene Thrombose, eine Verlängerung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit und der systemische Lupus erythematodes in der Krankengeschichte. Im Falle der vorangegangenen Thrombose wurden die Proben unmittelbar nach dem Ereignis eingesendet.

Informationen über die Krankengeschichte der Patienten wurden dem Krankenhausinformationssystem entnommen. Innerhalb der Kohorte traten nur venöse und keine arteriellen thrombotischen Ereignisse auf. Alle Patienten mit vorangegangenen thrombotischen Ereignissen galten als positiv für die weitere Analyse, unabhängig von der Anzahl der thrombotischen Ereignisse in der Vorgeschichte. Merkmale der Patienten, deren Proben in die Studie aufgenommen wurden, sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Merkmale der Patienten, deren Proben in die Studie aufgenommen wurden.

<b>Geschlechterverteilung</b>	
weiblich : männlich	38 : 25
<b>Patientenalter</b>	
Unteres Quartil / Median / Oberes Quartil	34,5 / 53,0 / 64,7
Patientenzahl mit Thrombose in der Vorgeschichte	22
<b>Lokalisation der Thrombose</b>	
Untere Extremitäten und Beckenvenen	12
Hirnvenen	3
Lungenembolie	7
<b>Anzahl der getesteten Patienten / Anzahl der Patienten positiv auf:</b>	
Protein-S-Mangel	36 / 0
Protein-C-Mangel	36 / 0
Antithrombin-Mangel	45 / 0
Faktor-V-Leiden-Mutation	37 / 6 heterozygot
Prothrombin-Mutation	37 / 0

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena an der Medizinischen Fakultät genehmigt (Votum N°2923-09/10). Siehe hierzu Seite VI im Anhang.

## **3.2 Proben**

### **3.2.1 Vorbereitung der Proben**

Um blutplättchenfreies Plasma zu erhalten, wurden die Proben routinemäßig zweimal zentrifugiert (Brandt et al. 1995) und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Alle Proben erfuhren einen Frost/Tau-Zyklus. Gelagert wurden zwei Teilmengen, eine für die anfängliche Diagnostik und ein Back-up-Aliquot.

### **3.2.2 Messung der dRVVT und aPTT**

Im Rahmen der Routinediagnostik des Labors wurden richtlinienkonform (Miyakis et al. 2006) zwei Tests durchgeführt: dRVVT (LAC Screen / Confirm, Instrumentation Laboratory) und aPTT (MixCon-LA, Instrumentation Laboratory). Die Zusammensetzung dieser Reagenzien ist im Kapitel 3.3 beschrieben. LAC Screen / Confirm wurde gemäß den Vorgaben des Herstellers auf dem ACL-Top-Analyser (Instrumentation Laboratory) gemessen. Die aus der Routinediagnostik bereits vorliegenden Ergebnisse flossen in die Auswertung mit ein.

Die Proben galten als LA-negativ, wenn der LAC-Screen-Testergebnis bei  $<45$  sek. lag. Proben mit LAC-Screen-Testergebnis  $>45$  sek. wurden auf LAC-Screen-Ratio (Patientenplasma-LAC-Screen geteilt durch Normalplasma-LAC-Screen) getestet und galten als negativ, wenn das Verhältnis bei  $<1,2$  lag. Bei den Proben mit LAC-Screen-Ratio  $\geq 1,2$  wurde die LAC-Confirm-Ratio (Patientenplasma-LAC-Confirm geteilt durch Normalplasma-LAC-Confirm) mit hoher Phospholipidkonzentration bestimmt. Die Proben galten als LA-positiv, wenn die normalisierte LAC Ratio (LAC-Screen-Ratio geteilt durch LAC-Confirm-Ratio)  $\geq 1,2$  betrug.

### **3.2.3 Tests auf Protein-S-, Protein-C-, Antithrombin-Mangel, Faktor-V-Leiden- und Prothrombin-Mutation**

Die Tests auf Antithrombin-, Protein-C-, Protein-S-Mangel (HemosIL Liquid Antithrombin, HemosIL Protein C, HemosIL ProS; Instrumentation Laboratory), auf Faktor-V-Leiden- und Prothrombin-G20210A-Mutation (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland), auf aCL-AK und  $\alpha\beta_2\text{GPI-AK}$  (Algeria<sup>®</sup>-Analyser, Organtec, Mainz, Deutschland) erfolgten im Rahmen der Routinediagnostik des Labors. Die bereits vorliegenden Daten flossen in die Auswertung mit ein.

Proben von heterozygoten Faktor-V-Leiden-Patienten wurden nicht ausgeschlossen, weil die Faktor-V-Leiden-Mutation erst nach Zugabe von aktiviertem Protein C (APC) zu einer veränderten Thrombinbildung führt (Hezard et al. 2006, Hron et al. 2006, Chaireti et al. 2009).

### 3.2.4 Messung der Thrombingenerierung

Nach einer Kalibrierung wurde die Messung der Thrombingenerierung mit dem BioTek® FLx800™TBI Fluorometer durchgeführt. Die Reagenzien, die Kalibratoren und Kontrollen wurden nach den Empfehlungen des Herstellers (Technoclone, Wien, Österreich) verwendet. Es wurden gleichzeitig jeweils zwei Tests durchgeführt:

- mit einer hohen Phospholipidkonzentration ( $RC_{HIGH}$ ) und
- mit einer niedrigen Phospholipidkonzentration ( $RC_{LOW}$ ).

Die Umwandlung des Substrats wurde 60 Minuten lang überwacht und in Intervallen von einer Minute gemessen. *Lag time*, *peak height*, *time to peak* und *area under the curve* wurden mithilfe der BioTek®KC4™Gen5™ Software bestimmt. Alle Proben wurden zweifach analysiert.

### 3.3 Reagenzien

#### 3.3.1 TECHNOTHROMBIN® TGA™

Das TGA Reagenz C enthält Phospholipidmizellen mit einem rekombinant hergestellten Gewebefaktor im Tris-Hepes-NaCl-Puffer (Technoclone Ltd. 2006).

Im Einzelnen:

- TGA Reagenz C Low (RC<sub>LOW</sub>): Niedrige Konzentration von Phospholipidmizellen;
- TGA Reagenz C High (RC<sub>HIGH</sub>): Hohe Konzentration von Phospholipidmizellen;
- TGA Substrat: Fluorogenes Substrat - Z-Gly-Gly-Arg-AMC mit CaCl<sub>2</sub>;
- TGA Puffer: Hepes-NaCl-Puffer mit Rinderserumalbumin;
- TGA Thrombin Kalibrator: Thrombin in Puffer mit Rinderserumalbumin;
- TGA Kontrolle 1 (C1): Normales Humanplasma, lyophilisiert (lyo.);
- TGA Kontrolle 2 (C2): Humanplasma mit erhöhter Thrombingenerierung, lyo.;
- TGA Kontrolle 3 (C3): Humanplasma mit verminderter Thrombingenerierung, lyo.

Hersteller:

Technoclone GmbH, Brunner Str. 67, 1230 Wien, Österreich.

#### 3.3.2 IL Test™ MixCon LA

Bei MixCon LA handelt es sich um ein flüssiges aPTT-Reagenz, welches Phospholipide, Calcium, Puffer, Stabilisatoren und Konservierungsmittel enthält (Instrumentation Laboratory Company 2002).

Im Einzelnen:

- aPTT high sensitivity: Niedrige Konzentration von Phospholipiden;
- aPTT low sensitivity: Hohe Konzentration von Phospholipiden;
- CaCl<sub>2</sub>-Reagenz mit Polybren, Farbstoff und Konservierungsmittel;
- Normalplasma, lyo.;
- Pathologisches Lupuskontrollplasma, lyo.

Hersteller:

Instrumentation Laboratory GmbH, Klausnerring 4, 85551 Kirchheim, Deutschland.

### **3.3.3 LAC Screen / Confirm HemosIL™**

Bei LAC Screen / Confirm HemosIL™ handelt es sich um ein lyophilisiertes dRVVT-Reagenz, mit einem Extrakt aus dem Gift der Kettenviper (*Daboia russelii*), Phospholipiden, Calcium, Polybren, Puffer, Stabilisatoren, Farbstoffen und Konservierungsmittel (Instrumentation Laboratory Company 2005).

Im Einzelnen:

- LAC Screen: Niedrige Konzentration von Phospholipiden;
- LAC Confirm: Hohe Konzentration von Phospholipiden.

Hersteller:

Instrumentation Laboratory GmbH, Klausnerring 4, 85551 Kirchheim, Deutschland.

### 3.4 Methoden der statistischen Analyse

Zum Vergleich der jeweiligen zwei Untergruppen im Hinblick auf die Signifikanz der Nicht-Übereinstimmung der Ergebnisverteilung wurde der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test verwendet. Die Beurteilung erfolgte anhand der zweiseitigen asymptotischen Signifikanz. Der Test gehört seit Jahrzehnten zu den statistischen Standardverfahren und findet in dieser Arbeit keine nähere Erörterung (Mann und Whitney 1947). Im Folgenden werden nur die Logistische Regressionsanalyse und *Receiver Operating Characteristics Analysis* erwähnt.

#### 3.4.1 Logistische Regressionsanalyse

Die Regressionsanalyse ist ein statistisches Analyseverfahren. Es ermöglicht Beziehungen zwischen einer abhängigen und einer oder mehreren unabhängigen Variablen zu erschließen. Hierbei ist es möglich, die Zusammenhänge quantitativ zu beschreiben oder Werte der abhängigen Variablen zu prognostizieren (Backhaus 2006). Die logistische Regressionsanalyse erlaubt es die Variablen, die die Gruppenunterschiede produzieren, zu identifizieren und die Stärke und Richtung ihres Einflusses zu bestimmen. Bei der logistischen Regressionsanalyse werden Wahrscheinlichkeiten der Gruppenzugehörigkeit geschätzt. So sind Aussagen darüber möglich, wie sich die Wahrscheinlichkeit der Gruppenzugehörigkeit bei Änderung des Wertes der unabhängigen Variablen ändert (Fromm 2005).

Bei der hierarchischen logistischen Regressionsanalyse, auch schrittweise Regression genannt, wird schrittweise zunächst die erklärungsstärkste unabhängige Variable aufgenommen (Vorwärtsselektion) bzw. die erklärungschwächste aus dem vollständigen Modell entfernt (Rückwärtsselektion).

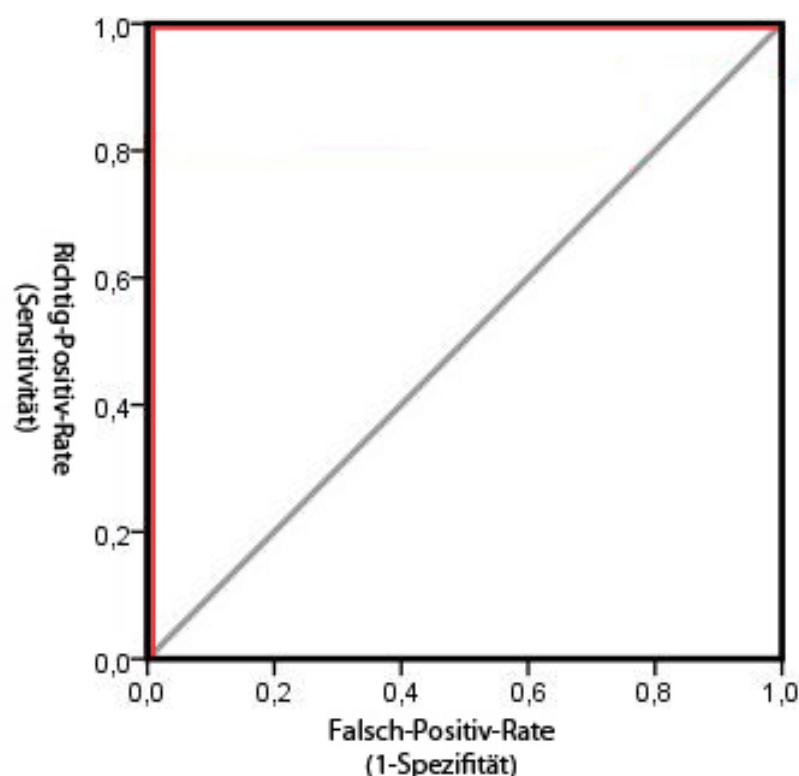
#### 3.4.2 *Receiver Operating Characteristics Analysis*

*Receiver Operating Characteristics Analysis* (ROC-Analyse) ist eine Methode zur Bewertung eines Analyseverfahrens und eignet sich zur Analyse eines Diagnoseverfahrens. Ursprünglich wurde die Methode im Rahmen der Signalentdeckungstheorie im Militärbereich mit dem Ziel entwickelt, die Radar-Technik zu verbessern (Green und Swets 1974). Über die Jahre fand es Einzug unter anderem in die psychologische und medizinische Forschung.

Für jeden möglichen Wert eines Parameters werden die relativen Häufigkeitsverteilungen in Form von Richtig-Positiv-Rate (Sensitivität) und Falsch-Positiv-Rate ( $1 - \text{Spezifität}$ ) berechnet. Im nächsten Schritt werden die Werte für Richtig-Positiv-Rate auf der Ordinate und die Werte für Falsch-Positiv-Rate auf der Abszisse dargestellt. Die Fläche unter dieser Kurve, auch Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve)

genannt, dient der Beurteilung der Güte eines Diagnoseverfahrens (Schumacher und Schulgen-Kristiansen 2002, Lasko et al. 2005).

Erlaubt ein Diagnoseverfahren eine perfekte Differenzierung zwischen zwei Gruppen, steigt die ROC-Kurve zunächst senkrecht an, schmiegt sich in die linke obere Ecke (Eckpunkt  $(0,1)$ ) und verläuft anschließend waagerecht, wie in Abbildung 3 dargestellt. Die Fläche unter dieser ROC-Kurve beträgt eins. Können zwei Gruppen durch einen Parameter nicht differenziert werden, so ist die Wahrscheinlichkeit gleich 0,5, was der Trefferhäufigkeit eines Zufallsprozesses entspricht. Die ROC-Kurve liegt in diesem Fall auf der Winkelhalbierenden und die Fläche unter der ROC-Kurve ( $AUC_{ROC}$ ) beträgt 0,5 (Mansmann 2007).



Die ideale ROC-Kurve (rot) steigt zunächst senkrecht an, schmiegt sich in die linke obere Ecke und verläuft anschließend waagerecht. Die Winkelhalbierende ist grau dargestellt.

Abbildung 3: Ideale ROC-Kurve mit der Winkelhalbierenden.

## **3.5 Gerätschaft und Software**

### **3.5.1 Messung der Thrombingenerierung**

Die Messung der Thrombingenerierung erfolgte am BioTek® FLx800™TBI Fluorometer (Technoclone, Wien, Österreich; BioTek®, Winooski, USA). Der FLx800™TBI Fluorometer ist ein Multi-Detektions-Reader für Mikroplatten zur Fluoreszenz-Messung.

Zur Steuerung des Mikroplatten-Readers und zur Verwaltung der Testergebnisse wurde die mitgelieferte KC4™Gen5™-Software (BioTek®, Winooski, USA) verwendet.

### **3.5.2 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS 19 (IBM®, New York, USA), Microsoft® Excel (Microsoft®, Unterschleissheim, Deutschland) und Analyse-It (Analyse-It Software, Ltd, Leeds, UK). Analyse-It ist eine Erweiterung (Add-in) für Microsoft® Excel.

### **3.5.3 Illustrations- und Textverarbeitung**

Die Textverarbeitung erfolgte mit der MiKTeX-Distribution (Christian Schenk, Berlin, Deutschland) von L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X (Leslie Lamport, New York, USA). Die Illustrationen wurden mit SPSS 19 (IBM®, New York, USA) und lpe extensible drawing editor (Otfried Cheong, Daejeon, Korea) erstellt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Messungenauigkeit

Die Messungenauigkeit wurde durch wiederholte Analyse (n=16) einer Qualitätskontrollprobe gemessen. Die Gesamtunpräzision lag für alle TG-Parameter im Bereich <15%. Mit Abstand die niedrigsten Werte ergaben sich für *area under the curve* (AUC): 8,1% bei Verwendung des RC<sub>LOW</sub>-Reagenzes und 6,0% bei Verwendung des RC<sub>HIGH</sub>-Reagenzes. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Messungenauigkeit.

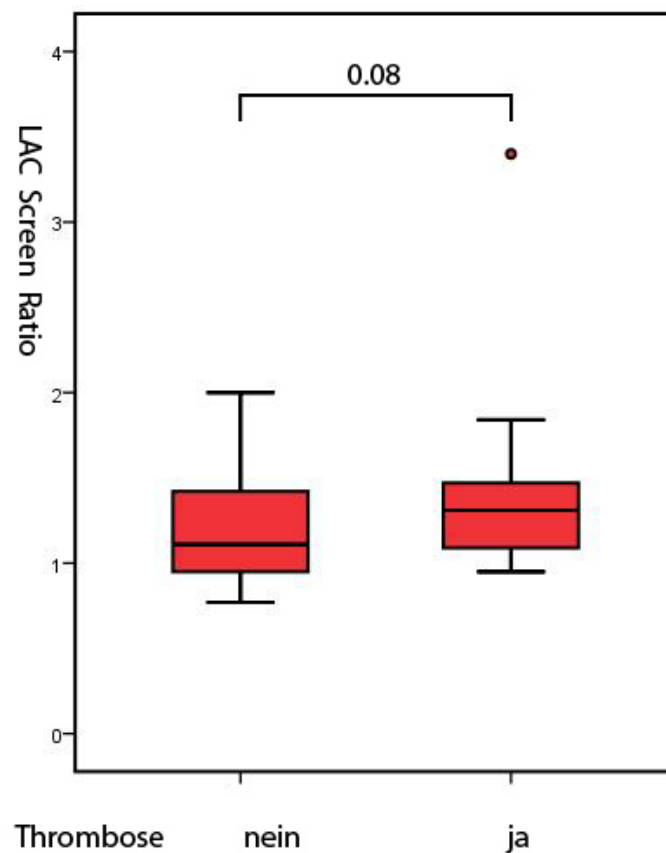
		Gesamtunpräzision	Tag-zu-Tag-Unpräzision
RC <sub>LOW</sub>	lag time	11,7%	8,8%
	time to peak	14,6%	12,9%
	peak height	12,9%	11,5%
	area under the curve	8,1%	7,2%
RC <sub>HIGH</sub>	lag time	11,7%	9,0%
	time to peak	11,5%	10,1%
	peak height	10,8%	8,4%
	area under the curve	6,0%	5,8%

### 4.2 Einfluss von a $\beta_2$ GPI-AK und aCL-AK auf Thrombingenerierung

Der Vergleich der TG-Parameter zwischen der Gruppe mit a $\beta_2$ GPI-AK (IgM und/oder IgG; n=11) und der Gruppe ohne a $\beta_2$ GPI-AK (n=52) sowie zwischen der Gruppe mit aCL-AK (IgM und/oder IgG; n=19) und der Gruppe ohne aCL-AK (n=44) zeigte keine signifikanten Unterschiede ( $p>0,05$ ). Daher wurde der Nachweis von oben genannten Antikörpern nachfolgend nicht berücksichtigt. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test verwendet.

### 4.3 Vergleich der TG-Parameter und LAC-Screen-Ratio zwischen Patienten mit und ohne Thrombose

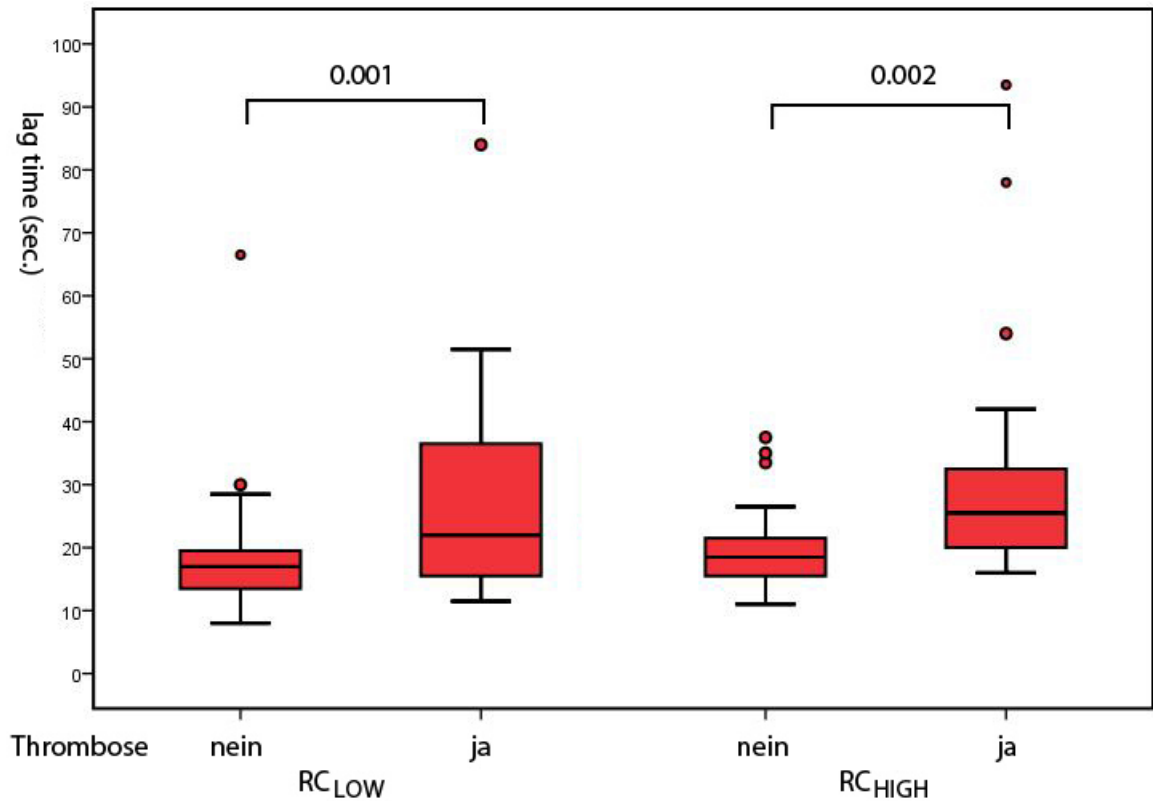
Die Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Gruppen im Hinblick auf Signifikanz der Nicht-Übereinstimmung der Verteilung der Ergebnisse erfolgten anhand des Mann-Whitney-Wilcoxon-Tests. Die Beurteilung erfolgte anhand der zweiseitigen asymptotischen Signifikanz. Der Vergleich der Verteilung der LAC-Screen-Ratio-Ergebnisse zwischen Gruppen mit und ohne Thrombose ergab einen p-Wert von 0,08 und somit keinen signifikanten Unterschied. Siehe Abbildung 4.



Box-Whisker-Plots. Ein Extremwert, der außerhalb des dreifachen Interquartilsabstands liegt, ist als ein Punkt dargestellt. Der p-Wert ist oberhalb der Boxen aufgetragen. Signifikanzniveau von 0,05.

Abbildung 4: Vergleich von LAC-Screen-Ratio zwischen Proben mit und ohne Thrombose in der Vorgeschichte.

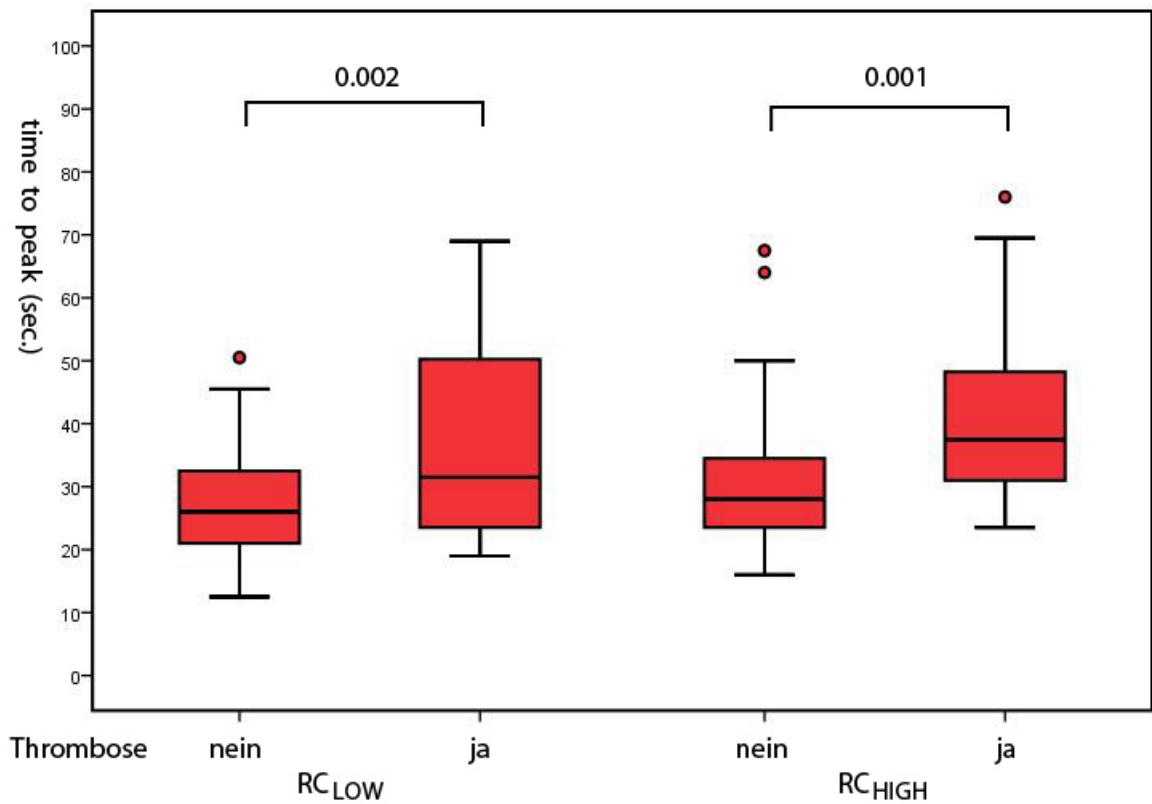
Der Vergleich der TG-Parameter ergab jedoch zum Teil signifikante Unterschiede (Abbildungen 5 bis 8). Der Vergleich der Verteilung der *lag-time*-Ergebnisse zwischen Gruppen mit und ohne Thrombose ergab für  $RC_{LOW}$  und für  $RC_{HIGH}$  jeweils einen signifikanten Unterschied. Siehe Abbildung 5.



Box-Whisker-Plots. Die Ausreißer, die zwischen der eineinhalbfachen und der dreifachen Interquartilweiten außerhalb der Box liegen, sind als größere Punkte dargestellt. Die Extremwerte, die außerhalb des dreifachen Interquartilsabstands liegen, sind als kleinere Punkte dargestellt. Die p-Werte sind oberhalb der Boxen aufgetragen. Die Verbindungslinien kennzeichnen die verglichene Gruppenkombination. Signifikanzniveau von 0,05.

Abbildung 5: Vergleich zwischen Proben mit und ohne Thrombose in der Vorgeschichte bei Induktion mit  $RC_{LOW}$  und  $RC_{HIGH}$  bezogen auf *lag time*.

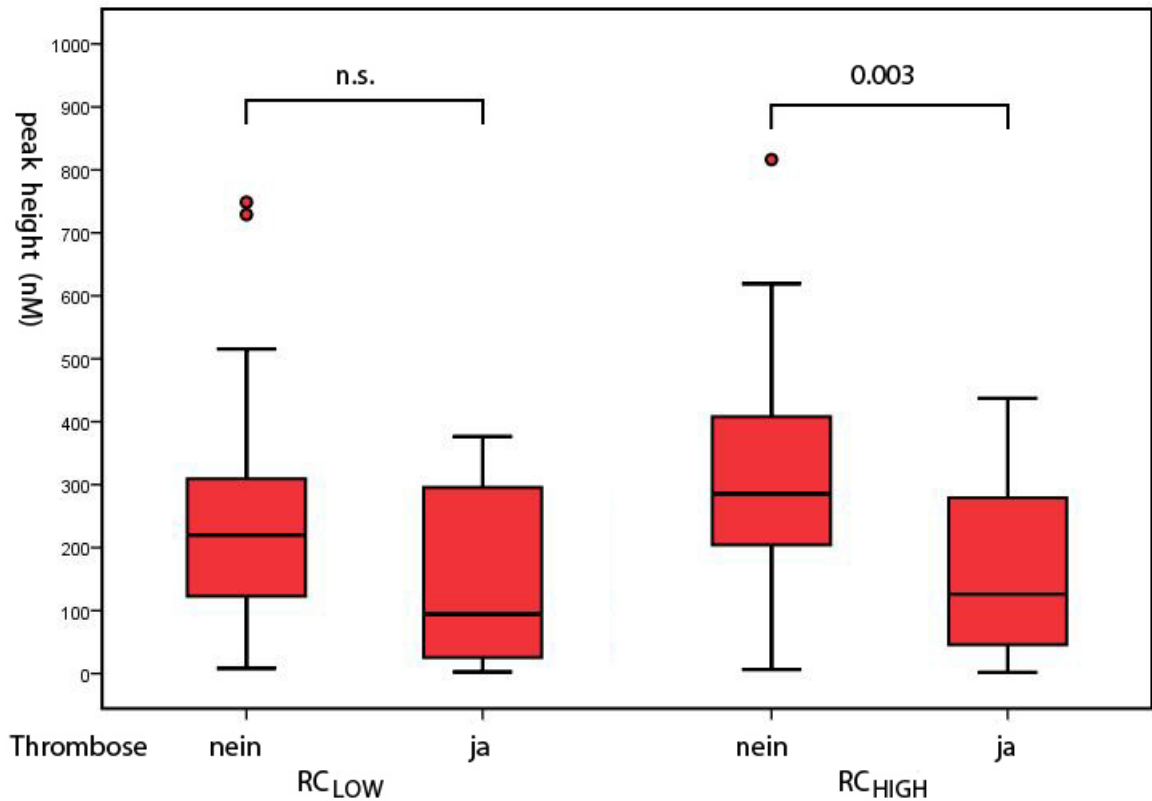
Der Vergleich der Verteilung der *time-to-peak*-Ergebnisse zwischen Gruppen mit und ohne Thrombose ergab für  $RC_{LOW}$  und für  $RC_{HIGH}$  jeweils einen signifikanten Unterschied. Siehe Abbildung 6.



Box-Whisker-Plots. Die Ausreißer, die zwischen der eineinhalbfachen und der dreifachen Interquartilweiten außerhalb der Box liegen, sind als Punkte dargestellt. Die p-Werte sind oberhalb der Boxen aufgetragen. Die Verbindungslinien kennzeichnen die verglichene Gruppenkombination. Signifikanzniveau von 0,05.

Abbildung 6: Vergleich zwischen Proben mit und ohne Thrombose in der Vorgeschichte bei Induktion mit  $RC_{LOW}$  und  $RC_{HIGH}$  bezogen auf *time to peak*.

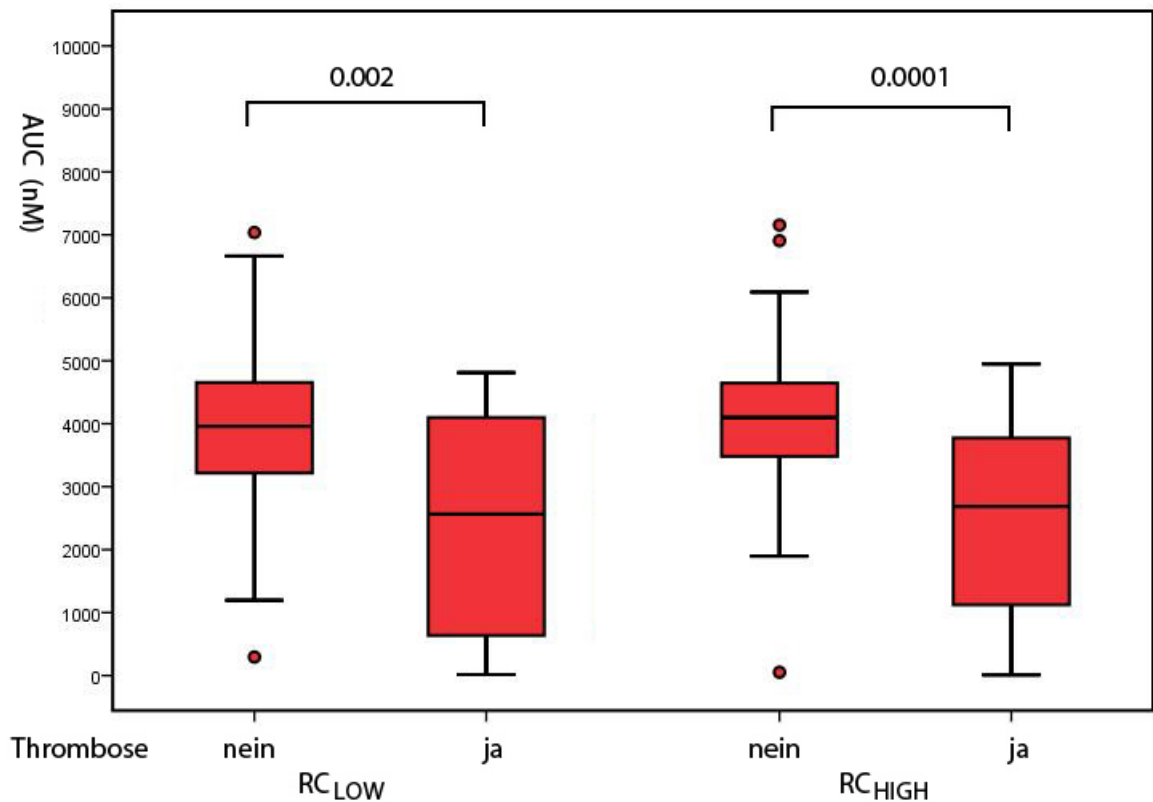
Die Nicht-Übereinstimmung der Verteilung der *peak-height*-Ergebnisse bei Verwendung des RC<sub>LOW</sub>-Reagenzes zwischen Gruppen mit und ohne Thrombose erwies sich als nicht signifikant (n.s.). Bei Verwendung des RC<sub>HIGH</sub>-Reagenzes ergab sich ein p-Wert von 0,003 und somit ein signifikanter Unterschied. Siehe Abbildung 7.



Box-Whisker-Plots. Die Ausreißer, die zwischen der eineinhalbfachen und der dreifachen Interquartilweiten außerhalb der Box liegen, sind als Punkte dargestellt. Die p-Werte sind oberhalb der Boxen aufgetragen. Der p-Wert  $>0,5$  ist nicht beziffert, da der Unterschied der Verteilung nicht signifikant (n.s.) ist. Die Verbindungslinien kennzeichnen die verglichene Gruppenkombination. Signifikanzniveau von 0,05.

Abbildung 7: Vergleich zwischen Proben mit und ohne Thrombose in der Vorgeschichte bei Induktion mit RC<sub>LOW</sub> und RC<sub>HIGH</sub> bezogen auf *peak height*.

Der Vergleich der Verteilung der AUC-Ergebnisse zwischen Gruppen mit und ohne Thrombose ergab für  $RC_{LOW}$  und für  $RC_{HIGH}$  jeweils einen signifikanten Unterschied. Siehe Abbildung 8.



Box-Whisker-Plots. Die Ausreißer, die zwischen der eineinhalbfachen und der dreifachen Interquartilweiten außerhalb der Box liegen sind als Punkte dargestellt. Die p-Werte sind oberhalb der Boxen aufgetragen. Die Verbindungslinien kennzeichnen die verglichene Gruppenkombination. Signifikanzniveau von 0,05.

Abbildung 8: Vergleich zwischen Proben mit und ohne Thrombose in der Vorgeschichte bei Induktion mit  $RC_{LOW}$  und  $RC_{HIGH}$  bezogen auf AUC.

#### 4.4 Vergleich der TG-Parameter nach Stratifizierung der Patienten nach LAC-Screen-Ratio und Thromboseanamnese

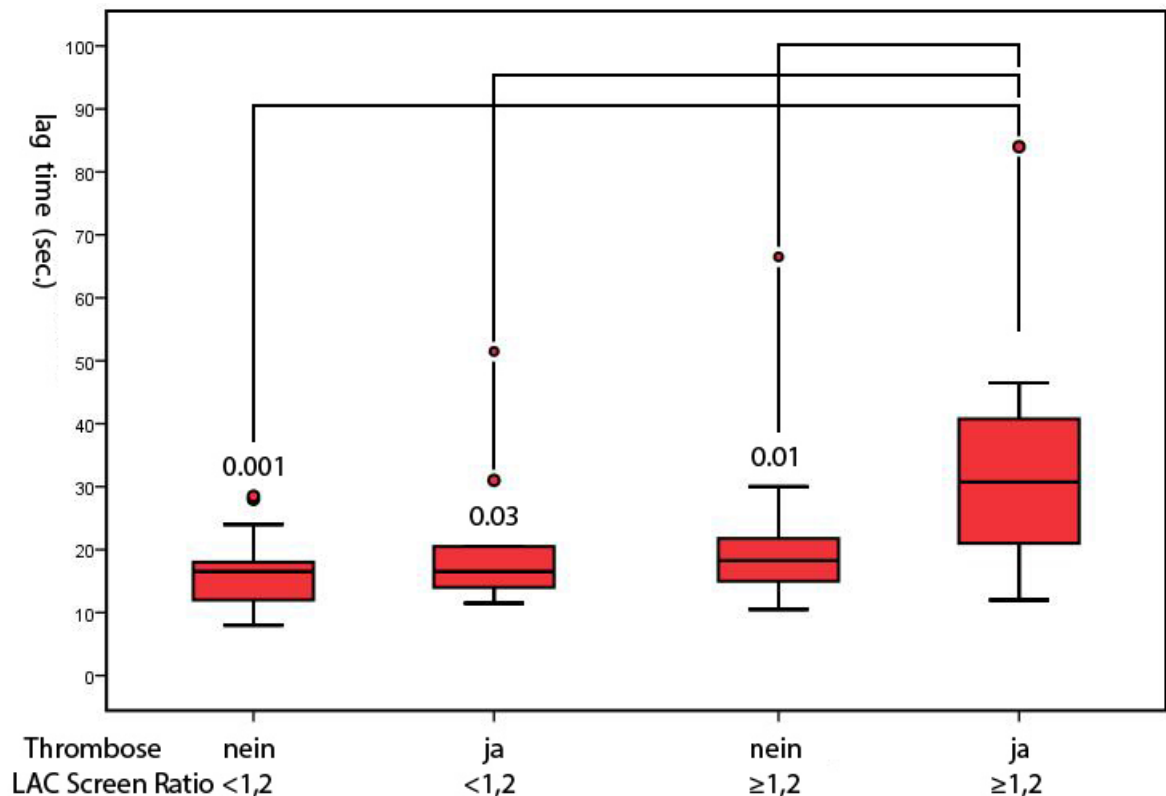
Die vorhergehende Dotplot-Analyse ergab eine weite Streuung der Ergebnisse in den jeweiligen Gruppen. Daher wurden die Patienten mit und ohne Thrombose anhand der LAC-Screen-Ratio in jeweils zwei Untergruppen aufgeteilt:

- Fälle ohne Thrombose und LAC-Screen-Ratio  $< 1,2$  (negativ)
- Fälle mit Thrombose und LAC-Screen-Ratio  $< 1,2$  (negativ)
- Fälle ohne Thrombose und LAC-Screen-Ratio  $\geq 1,2$  (positiv)
- Fälle mit Thrombose und LAC-Screen-Ratio  $\geq 1,2$  (positiv)

Der Vergleich zwischen den Untergruppen (Abbildungen 9 bis 16) zeigte, dass die TG-Parameter sich signifikant zwischen den Fällen ohne Thrombose (unabhängig von LAC-Screen-Ratio) und den Fällen mit Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio unterschieden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Induktion mit dem RC<sub>HIGH</sub>-Reagenz unterschieden sich bei Verwendung des RC<sub>LOW</sub>-Reagenzes zusätzlich die Parameter *lag time* und AUC (Abbildungen 9 und 15) zwischen den Fällen mit Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio und den Fällen mit Thrombose und einer negativen LAC-Screen-Ratio.

Der Vergleich der Verteilung der *lag-time*-Ergebnisse bei Verwendung des RC<sub>LOW</sub>-Reagenzes zwischen der Untergruppe mit Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio mit drei übrigen Untergruppen ergab jeweils einen signifikanten Unterschied. Im Vergleich mit der Untergruppe ohne Thrombose und einer negativen LAC-Screen-Ratio ergab sich ein p-Wert von 0,001. Im Vergleich mit der Untergruppe mit Thrombose und einer negativen LAC-Screen-Ratio ergab sich ein p-Wert von 0,03. Im Vergleich mit der Untergruppe ohne Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio ergab sich ein p-Wert von 0,01.

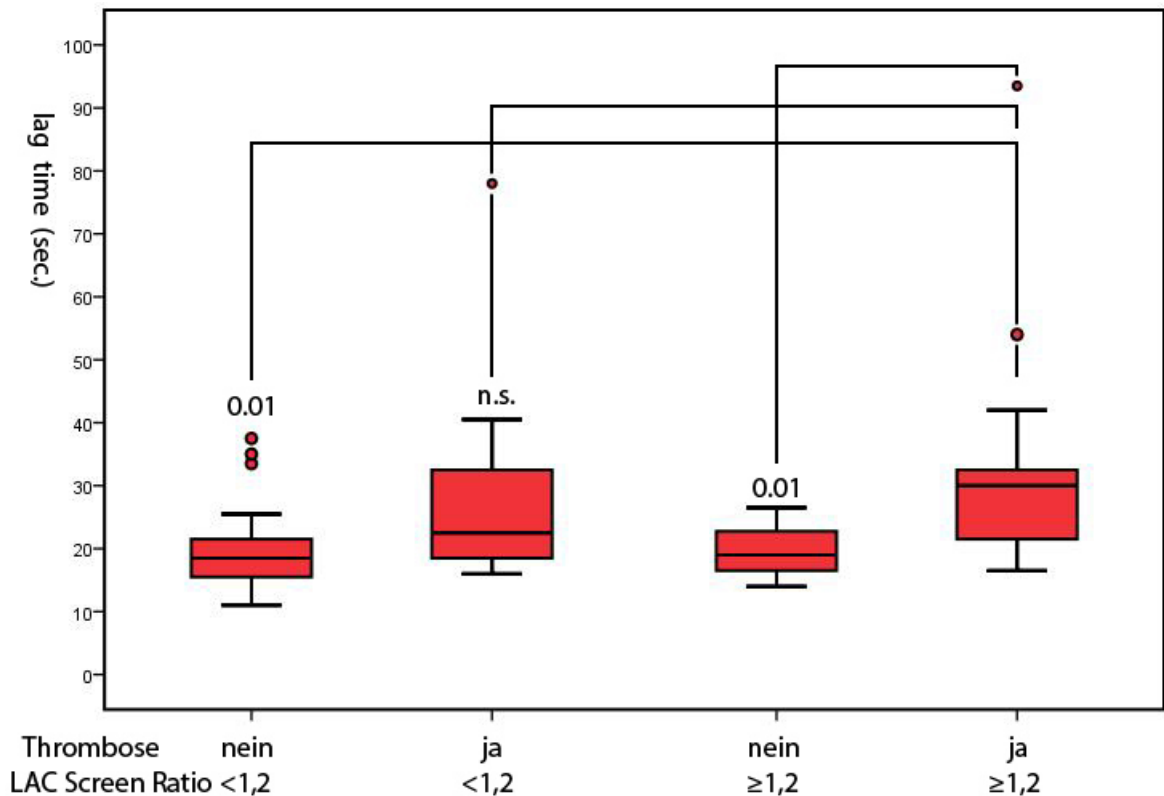


Box-Whisker-Plots. Die Ausreißer, die zwischen der eineinhalbfachen und der dreifachen Interquartilweiten außerhalb der Box liegen, sind als größere Punkte dargestellt. Die Extremwerte, die außerhalb des dreifachen Interquartilsabstands liegen, sind als kleinere Punkte dargestellt. Die p-Werte sind oberhalb der Boxen aufgetragen. Die Verbindungslinien kennzeichnen die verglichene Untergruppenkombination. Signifikanzniveau von 0,05.

Abbildung 9: Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit RC<sub>LOW</sub> bezogen auf *lag time*.



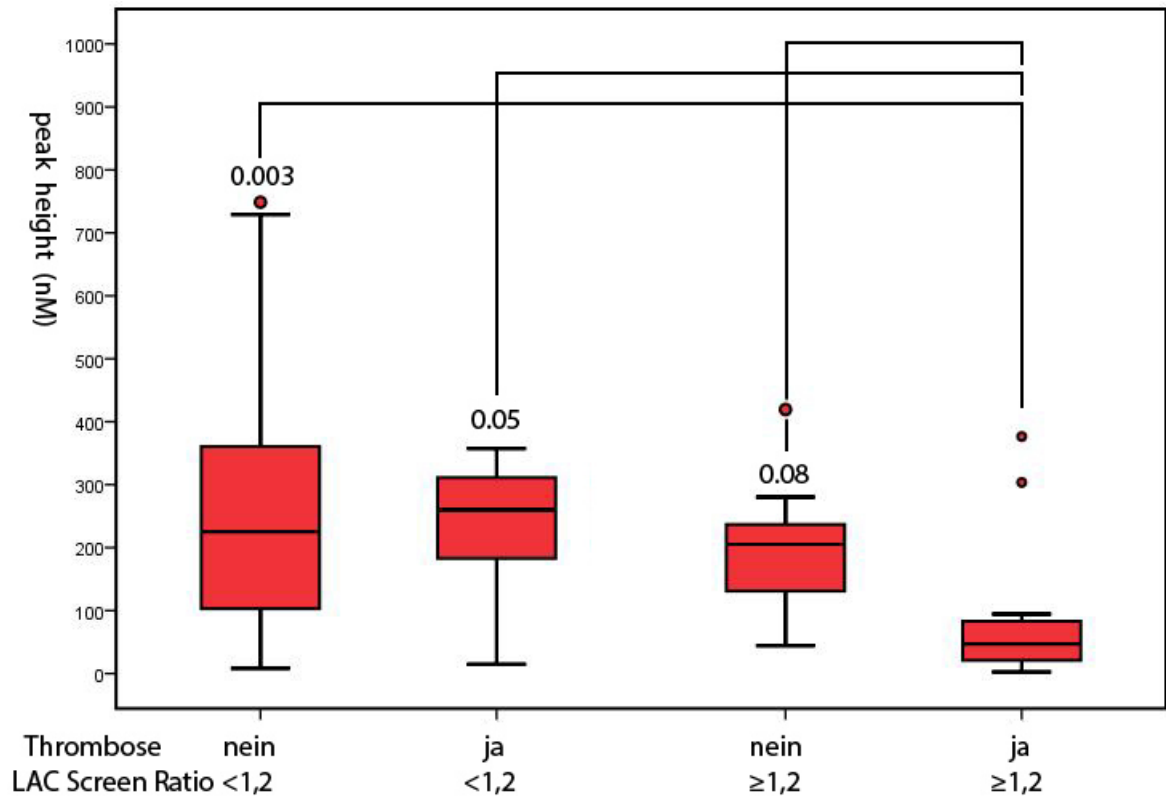
Der Vergleich der Verteilung der *lag-time*-Ergebnisse bei Verwendung des  $RC_{HIGH}$ -Reagenzes zwischen der Untergruppe mit Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio mit zwei Untergruppen ohne Thrombose ergab jeweils einen p-Wert von 0,01 und somit jeweils einen signifikanten Unterschied. Im Vergleich mit der Untergruppe mit Thrombose und einer negativen LAC-Screen-Ratio ergab sich kein signifikanter Unterschied.



Box-Whisker-Plots. Die Ausreißer, die zwischen der eineinhalbfachen und der dreifachen Interquartilweiten außerhalb der Box liegen, sind als größere Punkte dargestellt. Die Extremwerte, die außerhalb des dreifachen Interquartilsabstands liegen, sind als kleinere Punkte dargestellt. Die p-Werte sind oberhalb der Boxen aufgetragen. Der p-Wert  $>0,5$  ist nicht beziffert, da der Unterschied der Verteilung nicht signifikant (n.s.) ist. Die Verbindungslinien kennzeichnen die verglichene Untergruppenkombination. Signifikanzniveau von 0,05.

Abbildung 10: Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit  $RC_{HIGH}$  bezogen auf *lag time*.

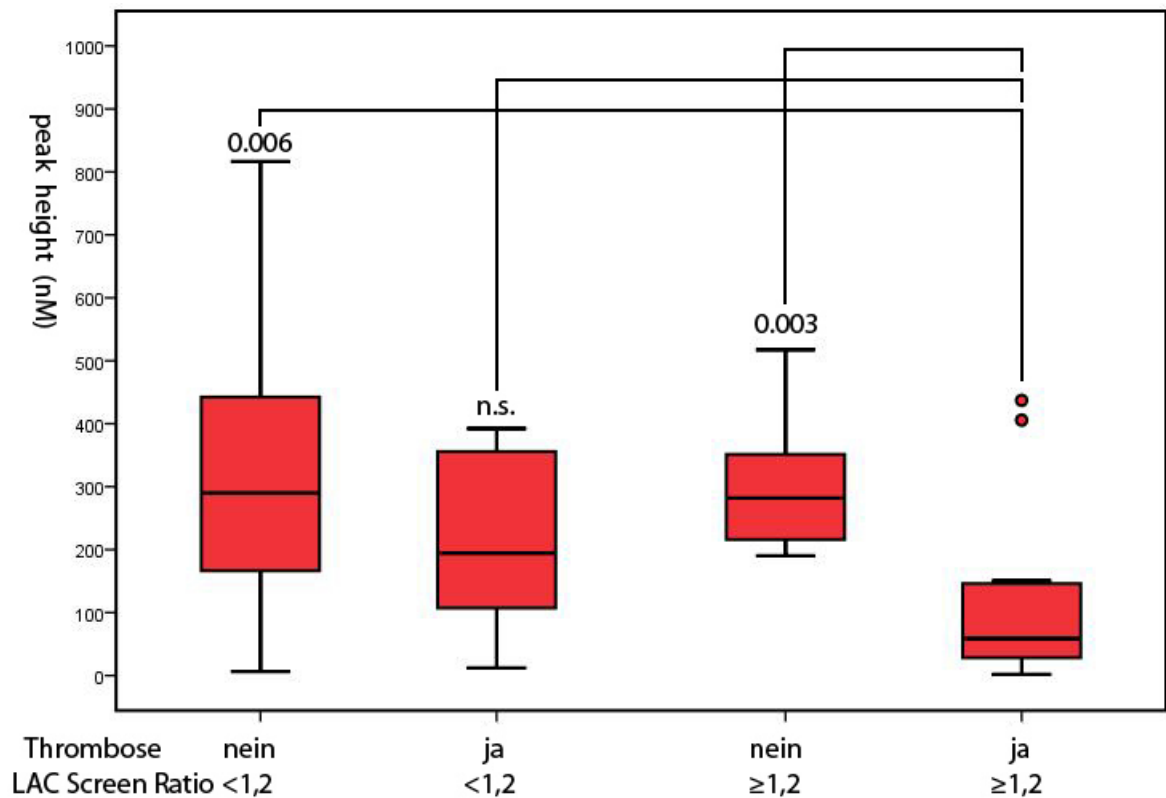
Der Vergleich der Verteilung der *peak-height*-Ergebnisse bei Verwendung des RC<sub>LOW</sub>-Reagenzes zwischen der Untergruppe mit Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio mit den drei übrigen Untergruppen ergab jeweils einen signifikanten Unterschied. Siehe Abbildung 11.



Box-Whisker-Plots. Die Ausreißer, die zwischen der eineinhalbfachen und der dreifachen Interquartilweiten außerhalb der Box liegen sind als größere Punkte dargestellt. Die Extremwerte, die außerhalb des dreifachen Interquartilsabstands liegen sind als kleinere Punkte dargestellt. Die p-Werte sind oberhalb der Boxen aufgetragen. Die Verbindungslinien kennzeichnen die verglichene Untergruppenkombination. Signifikanzniveau von 0,05.

Abbildung 11: Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit RC<sub>LOW</sub> bezogen auf *peak height*.

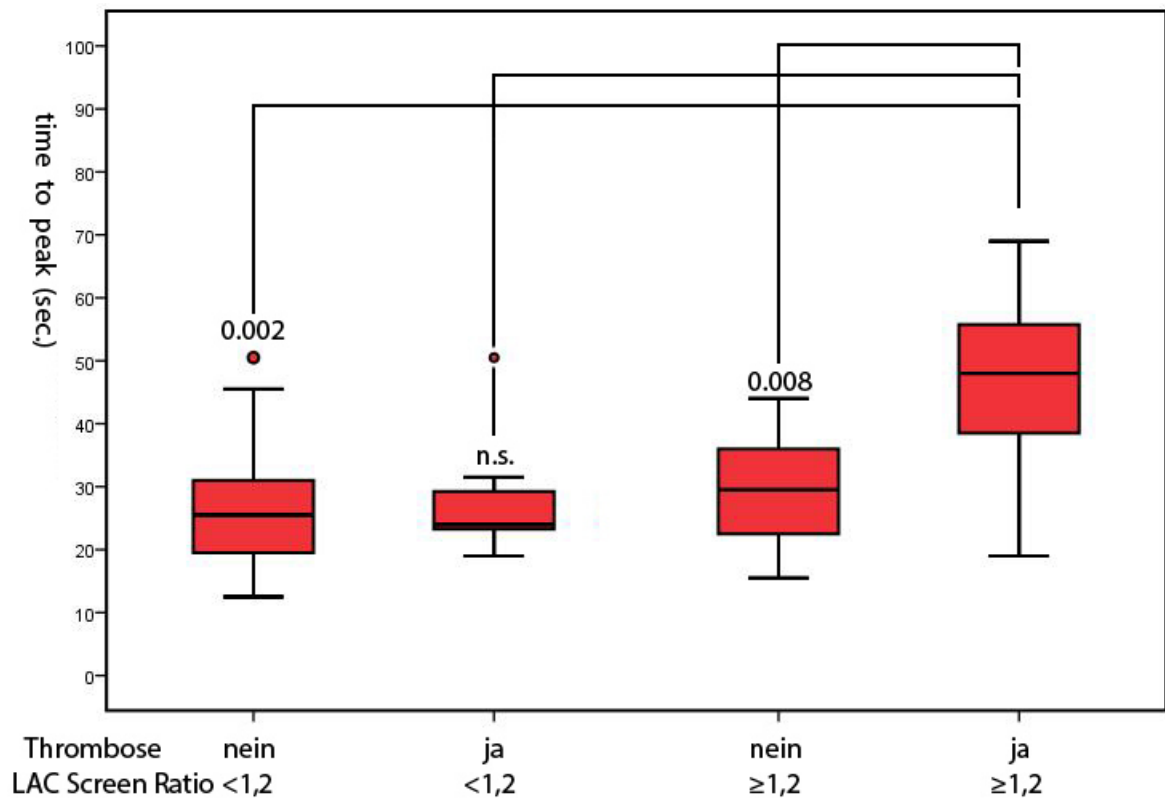
Der Vergleich der Verteilung der *peak-height*-Ergebnisse bei Verwendung des RC<sub>HIGH</sub>-Reagenzes zwischen der Untergruppe mit Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio mit zwei Untergruppen ohne Thrombose ergab jeweils einen signifikanten Unterschied. Im Vergleich mit der Untergruppe ohne Thrombose und einer negativen LAC-Screen-Ratio ergab sich ein p-Wert von 0,006 und im Vergleich mit der Untergruppe ohne Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio ergab sich ein p-Wert von 0,003. Im Vergleich mit der Untergruppe mit Thrombose und einer negativen LAC-Screen-Ratio ergab sich kein signifikanter Unterschied.



Box-Whisker-Plots. Die Ausreißer, die zwischen der eineinhalbfachen und der dreifachen Interquartilweiten außerhalb der Box liegen, sind als Punkte dargestellt. Die p-Werte sind oberhalb der Boxen aufgetragen. Der p-Wert  $>0,5$  ist nicht beziffert, da der Unterschied der Verteilung nicht signifikant (n.s.) ist. Die Verbindungslinien kennzeichnen die verglichene Untergruppenkombination. Signifikanzniveau von 0,05.

Abbildung 12: Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit RC<sub>HIGH</sub> bezogen auf *peak height*.

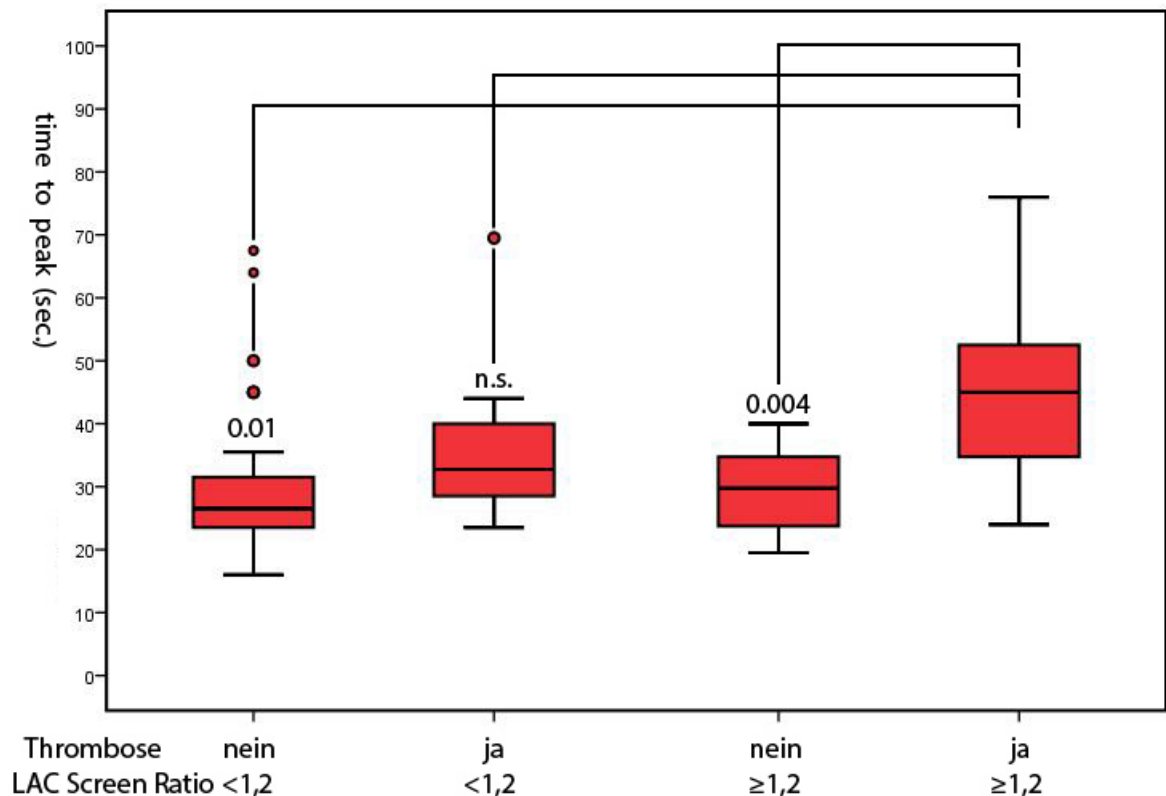
Der Vergleich der Verteilung der *time-to-peak*-Ergebnisse bei Verwendung des RC<sub>LOW</sub>-Reagenzes zwischen der Untergruppe mit Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio mit zwei Untergruppen ohne Thrombose ergab jeweils einen signifikanten Unterschied. Im Vergleich mit der Untergruppe ohne Thrombose und einer negativen LAC-Screen-Ratio ergab sich ein p-Wert von 0,002 und im Vergleich mit der Untergruppe ohne Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio ergab sich ein p-Wert von 0,008. Im Vergleich mit der Untergruppe mit Thrombose und einer negativen LAC-Screen-Ratio ergab sich kein signifikanter Unterschied.



Box-Whisker-Plots. Der Ausreißer, der zwischen der eineinhalbfachen und der dreifachen Interquartilweiten außerhalb der Box liegt, ist als ein größerer Punkt dargestellt. Der Extremwert, der außerhalb des dreifachen Interquartilsabstands liegt, ist als ein kleinerer Punkt dargestellt. Die p-Werte sind oberhalb der Boxen aufgetragen. Der p-Wert >0,5 ist nicht beziffert, da der Unterschied der Verteilung nicht signifikant (n.s.) ist. Die Verbindungslinien kennzeichnen die verglichene Untergruppenkombination. Signifikanzniveau von 0,05.

Abbildung 13: Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit RC<sub>LOW</sub> bezogen auf *time to peak*.

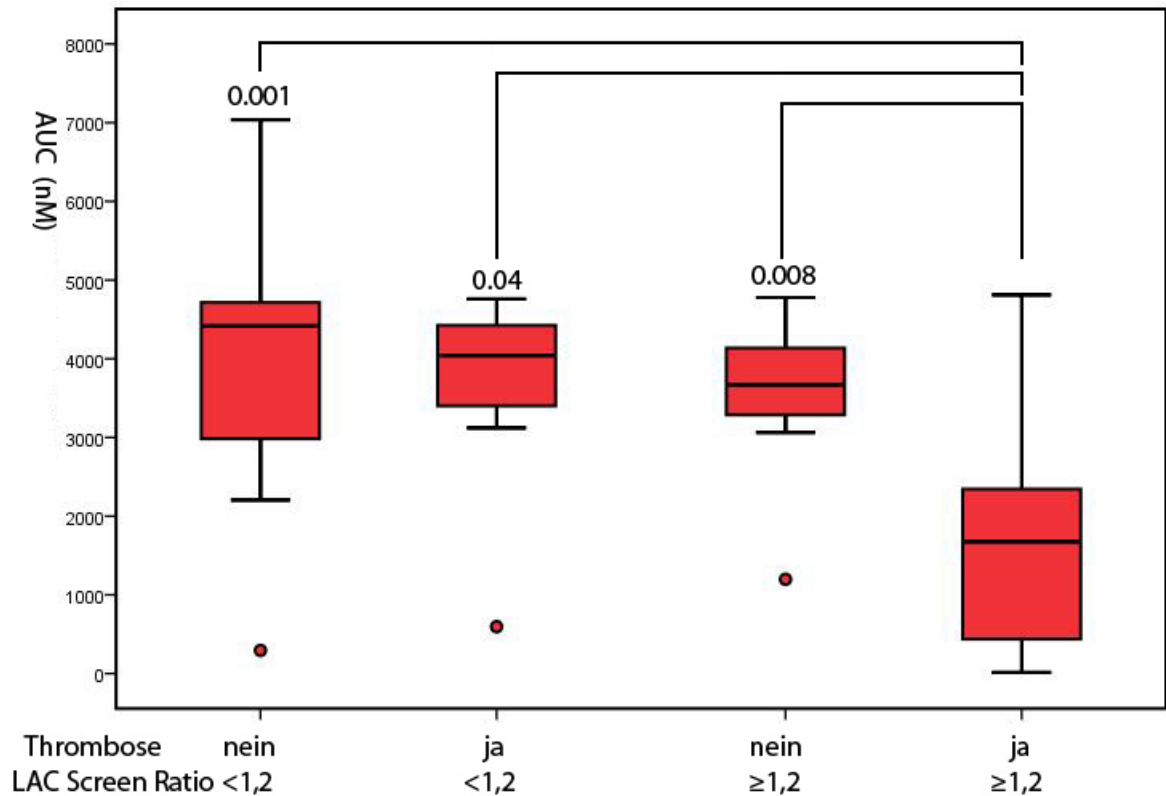
Der Vergleich der Verteilung der *time-to-peak*-Ergebnisse bei Verwendung des RC<sub>HIGH</sub>-Reagenzes zwischen der Untergruppe mit Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio mit zwei Untergruppen ohne Thrombose ergab jeweils einen signifikanten Unterschied. Im Vergleich mit der Untergruppe ohne Thrombose und einer negativen LAC-Screen-Ratio ergab sich ein p-Wert von 0,01 und im Vergleich mit der Untergruppe ohne Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio ergab sich ein p-Wert von 0,004. Im Vergleich mit der Untergruppe mit Thrombose und einer negativen LAC-Screen-Ratio ergab sich kein signifikanter Unterschied.



Box-Whisker-Plots. Die Ausreißer, die zwischen der eineinhalbfachen und der dreifachen Interquartilweiten außerhalb der Box liegen, sind als größere Punkte dargestellt. Die Extremwerte, die außerhalb des dreifachen Interquartilsabstands liegen, sind als kleinere Punkte dargestellt. Die p-Werte sind oberhalb der Boxen aufgetragen. Der p-Wert >0,5 ist nicht beziffert, da der Unterschied der Verteilung nicht signifikant (n.s.) ist. Die Verbindungslinien kennzeichnen die verglichene Untergruppenkombination. Signifikanzniveau von 0,05.

Abbildung 14: Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit RC<sub>HIGH</sub> bezogen auf time to peak.

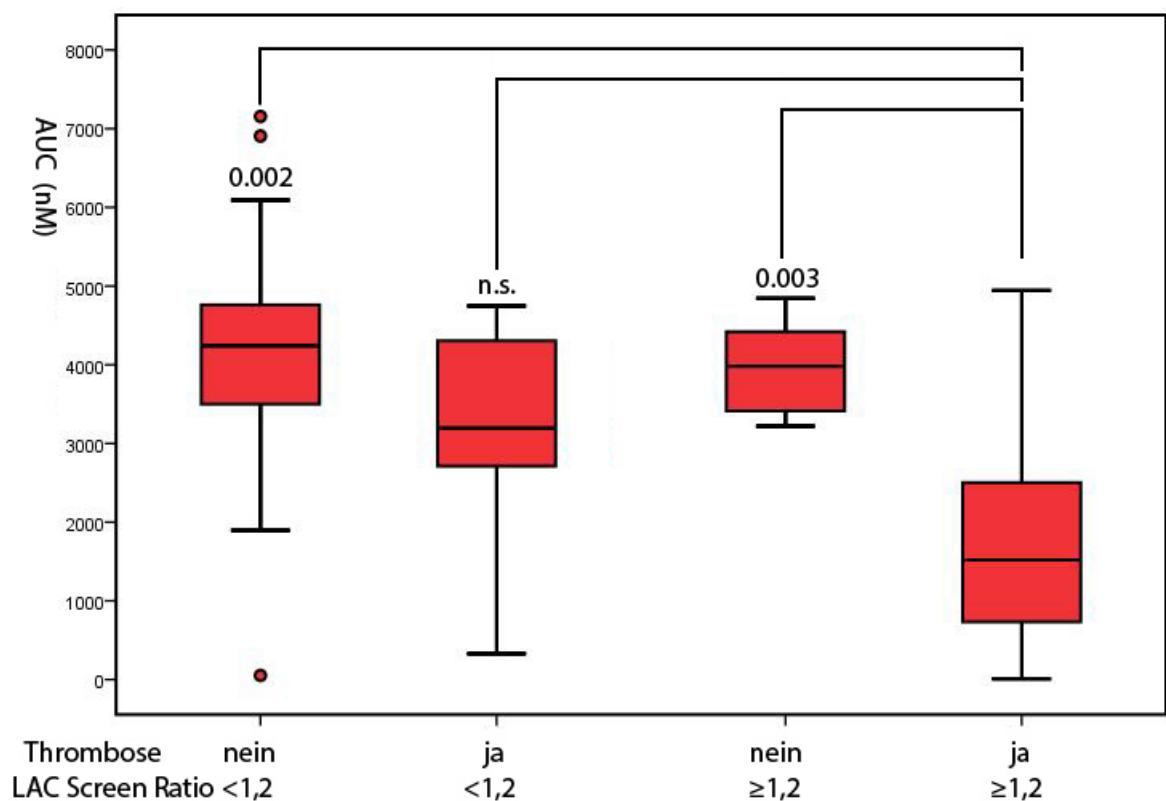
Der Vergleich der Verteilung der AUC-Ergebnisse bei Verwendung des  $RC_{LOW}$ -Reagenzes zwischen der Untergruppe mit Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio mit drei übrigen Untergruppen ergab jeweils einen signifikanten Unterschied. Siehe Abbildung 15.



Box-Whisker-Plots. Die Ausreißer, die zwischen der eineinhalbfachen und der dreifachen Interquartilweiten außerhalb der Box liegen, sind als Punkte dargestellt. Die p-Werte sind oberhalb der Boxen aufgetragen. Die Verbindungslinien kennzeichnen die verglichene Untergruppenkombination. Signifikanzniveau von 0,05.

Abbildung 15: Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit  $RC_{LOW}$  bezogen auf AUC.

Der Vergleich der Verteilung der AUC-Ergebnisse bei Verwendung des  $RC_{HIGH}$ -Reagenzes zwischen der Untergruppe mit Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio mit zwei Untergruppen ohne Thrombose ergab jeweils einen signifikanten Unterschied. Im Vergleich mit der Untergruppe ohne Thrombose und einer negativen LAC-Screen-Ratio ergab sich ein p-Wert von 0,002 und im Vergleich mit der Untergruppe ohne Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio ergab sich ein p-Wert von 0,003. Der Vergleich der Verteilung der AUC-Ergebnisse zwischen der Untergruppe mit Thrombose und einer positiven LAC-Screen-Ratio mit der Untergruppe mit Thrombose und einer negativen LAC-Screen-Ratio ergab keinen signifikanten Unterschied.



Box-Whisker-Plots. Die Ausreißer, die zwischen der eineinhalbfachen und der dreifachen Interquartilweiten außerhalb der Box liegen sind als Punkte dargestellt. Die p-Werte sind oberhalb der Boxen aufgetragen. Der p-Wert  $>0,5$  ist nicht beziffert, da der Unterschied der Verteilung nicht signifikant (n.s.) ist. Die Verbindungslinien kennzeichnen die verglichene Untergruppenkombination. Signifikanzniveau von 0,05.

Abbildung 16: Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit  $RC_{HIGH}$  bezogen auf AUC.

## 4.5 Logistische Regressionsanalyse zur Detektion des erklärungsstärksten Prädiktors

LAC-Screen-Ratio und die TG-Parameter (*lag time*, *time to peak*, *peak height*, AUC) wurden der hierarchischen Regressionsanalyse unterzogen, um den erklärungsstärksten Prädiktor für vorausgegangene Thrombose zu identifizieren. Die Variablen wurden in der Reihenfolge in die Analyse aufgenommen, in der sie die statistische Signifikanz des Modells maximieren. Die Variablen wurden schrittweise einbezogen und das Modell wurde neu berechnet, bis nur noch Variablen mit  $p < 0,05$  im Modell verblieben. Unter den untersuchten Parametern zeigte sich AUC, bei Verwendung des RC<sub>HIGH</sub>-Reagenzes, als bester Prädiktor einer früheren Thrombose. Siehe hierzu Tabelle 5.

Tabelle 5: Ergebnis der hierarchischen Regressionsanalyse für AUC und Thrombose als abhängige Variable bei Verwendung des RC<sub>HIGH</sub>-Reagenzes.

	<b>Regressions- koeffizient B</b>	<b>Standard- fehler</b>	<b>Wald</b>	<b>P</b>	<b>Exp (B)</b>
AUC (RC <sub>HIGH</sub> )	-0,001	0,000	9,434 (df = 1)	0,002	0,999
Konstante	1,653	0,831	3,953 (df = 1)	0,047	5,223

## 4.6 ROC-Analyse der TG-Parameter zur Beurteilung der Trennschärfe in Bezug auf vorangegangene Thrombose

Eine ROC-Analyse aller TG-Parameter der vorselektierten LAC-Screen-Ratio-positiven Proben (n=29; 13 Thrombose, 16 keine Thrombose) ergab hohe AUC<sub>ROC</sub>-Werte für alle Parameter in Bezug zur vorherigen Thrombose. Siehe hierzu Tabelle 6. Die ROC-Analyse wurde ebenfalls bei den LAC-Screen-Ratio-negativen Proben durchgeführt (n=34; 9 Thrombose, 25 keine Thrombose). In dieser Gruppe ließen die TG-abgeleiteten Parameter nicht oder wenig zwischen den Thrombose-negativen und -positiven Gruppen diskriminieren. Das Konfidenzintervall (KI) wurde auf 95% festgelegt.

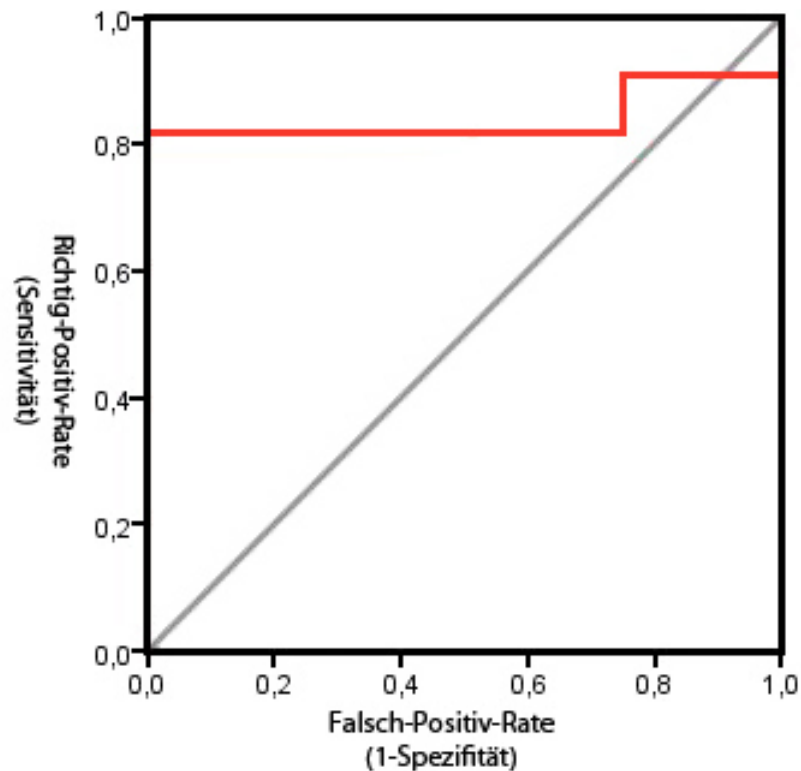
Insgesamt zeigten vier Proben eine gehemmte Thrombingenerierung, sodass nicht alle TG-Parameter abgeleitet werden konnten. Siehe hierzu Tabelle 6. Drei dieser Proben wiesen eine positive LAC-Screen-Ratio und eine positive normalisierte LAC-Ratio (LAC-Screen-Ratio / LAC-Confirm-Ratio) auf. In zwei dieser Fälle lag eine Thrombose vor. Eine Probe wies eine negative LAC-Screen-Ratio auf. Bei dem letzten Fall lag eine Thrombose vor und es fiel im Screening eine veränderte MixCon-LA-Ratio auf.



Tabelle 6: Ergebnis der ROC-Analyse zur Beurteilung der nach LAC-Screen-Ratio vorselektierten TG-Parameter bezogen auf Thrombose in der Vorgeschichte.

	Reagenz	Parameter	AUC <sub>ROC</sub> (KI 95%)	In die Analyse nicht eingeflossene Fälle
		dRVVT	0,46 (0,24 - 0,68)	
<b>LAC-S-Ratio</b>				
<b>≥1,2 (n=29)</b>				
	RC <sub>LOW</sub>	lag time	0,76 (0,56 - 0,97)	1 mit Thrombose
	RC <sub>LOW</sub>	peak height	0,80 (0,57 - 1,00)	2 mit, 1 ohne Thrombose
	RC <sub>LOW</sub>	time to peak	0,80 (0,58 - 1,00)	2 mit, 1 ohne Thrombose
	RC <sub>LOW</sub>	AUC	0,81 (0,57 - 1,00)	2 mit, 1 ohne Thrombose
	RC <sub>HIGH</sub>	lag time	0,83 (0,68 - 0,98)	
	RC <sub>HIGH</sub>	peak height	0,82 (0,60 - 1,00)	2 mit Thrombose
	RC <sub>HIGH</sub>	time to peak	0,80 (0,61 - 0,99)	2 mit Thrombose
	RC <sub>HIGH</sub>	AUC	0,83 (0,60 - 1,00)	2 mit Thrombose
<b>LAC-S-Ratio</b>				
<b>≤1,2 (n=34)</b>				
	RC <sub>LOW</sub>	lag time	0,59 (0,36 - 0,82)	
	RC <sub>LOW</sub>	peak height	0,51 (0,30 - 0,72)	1 mit Thrombose
	RC <sub>LOW</sub>	time to peak	0,50 (0,27 - 0,73)	1 mit Thrombose
	RC <sub>LOW</sub>	AUC	0,57 (0,35 - 0,78)	1 mit Thrombose
	RC <sub>HIGH</sub>	lag time	0,72 (0,53 - 0,91)	
	RC <sub>HIGH</sub>	peak height	0,61 (0,39 - 0,83)	1 mit Thrombose
	RC <sub>HIGH</sub>	time to peak	0,70 (0,50 - 0,90)	1 mit Thrombose
	RC <sub>HIGH</sub>	AUC	0,67 (0,46,- 0,87)	1 mit Thrombose

Wie im Kapitel 4.5 erwähnt, wurde AUC (bei Verwendung des RC<sub>HIGH</sub>-Reagenzes) als bester Prädiktor einer Thrombose detektiert. Siehe hierzu Tabelle 5 auf Seite 46. Zur Beurteilung der diagnostischen Güte wurde die entsprechende ROC-Kurve verwendet. Siehe hierzu Abbildung 17. Bis auf den Bereich einer hohen falsch-positiven Rate (ca. 0,9) bei einer hohen Sensitivität (ca. 0,9) verläuft die ROC-Kurve mit einem deutlichen Abstand zu der Winkelhalbierenden, was auf eine hohe Messgüte des Parameters schließen lässt.



Die ROC-Kurve ist rot dargestellt. Die Winkelhalbierende ist grau dargestellt.

Abbildung 17: ROC-Kurve bezogen auf AUC bei positiver LAC-Screen-Ratio und Induktion mit RC<sub>HIGH</sub>.

## 5 Diskussion

In der klinischen Praxis folgt das Thrombophiliescreening in der Regel einem thrombotischen Ereignis. Dieses zielt darauf ab, das Wiederholungsrisiko einzuschätzen, um die Patienten zu selektieren, die von einer verlängerten medikamentösen Antikoagulation profitieren würden. Die geltenden Richtlinien erfordern einen Nachweis von

- Lupusantikoagulans oder
- $\beta_2$ GPI-abhängigen Anti-Cardiolipin-Antikörpern oder
- Anti- $\beta_2$ -Glycoprotein I-Antikörpern

Der LA-Nachweis erfordert wiederum mehrere Schritte in dieser Reihenfolge:

- i. verlängerte phospholipidabhängige Gerinnungszeit in einem Globaltest
  - aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) oder
  - *diluted Russell's Viper Venom Time* (dRVVT) oder
  - *Kaolin Clotting Time* oder
  - *Textarin Time* oder
  - verdünnte Prothrombinzeit
- ii. keine Normalisierung der Gerinnungszeit im Plasmaaustauschversuch und
- iii. eine Korrektur der Zeit durch den Zusatz von Phospholipiden im Überschuss

Von *International Society on Thrombosis and Haemostasis* wird aktuell zum LA-Nachweis nur die Verwendung von aPTT und dRVVT empfohlen (Pengo et al. 2009). Je nach den verwendeten Assays unterscheiden sich die prädiktiven Werte zur Detektion von Patienten mit vorangegangener Thrombose (Swadzba et al. 2011, Galli et al. 2000). Erst eine ausreichend aussagekräftige Prädiktion der Thromboseneigung würde eine adäquate antikoagulatorische Therapie ermöglichen. Zusätzlich zu den genannten Tests könnte die Messung der Thrombingenerierung die diagnostische Spezifität erhöhen.

Der Vergleich von LAC-Screen-Ratio zwischen Proben mit und ohne Thrombose in der Anamnese (Abbildung 4) ergab keinen signifikanten Unterschied. Die Verwendung eines Schlangengiftes mit biologischer Variabilität, sowie die Heterogenität des Krankheitsbildes Thrombose liefern einen möglichen Erklärungsansatz.

Beim Vergleich der TG-Parameter zwischen Patienten mit und ohne Thrombose fiel eine relativ breite Streuung der Ergebnisse innerhalb der einzelnen Gruppen auf. Die Stratifizierung der Proben nach dem Ergebnis der LAC-Screen-Ratio führte zu einer homogenen Verteilung der Ergebnisse der TG-Parameter. Die Proben von Patienten

mit einer positiven LAC-Screen-Ratio und einer Thrombose in der Vorgeschichte unterschieden sich bei allen TG-Parametern signifikant von Proben der Patienten ohne Thrombose in der Vorgeschichte (Abbildungen 9 bis 16).

Die Verlängerung von *time to peak* und *lag time* einerseits und die Abnahme von AUC und *peak height* andererseits wurden überwiegend in Proben beobachtet, in denen die Phospholipid-Abhängigkeit der Gerinnungshemmer bereits zuvor nachgewiesen wurde. Dies wurde bereits für das Lupusantikoagulans in der Vergangenheit gezeigt (Devreese et al. 2009, Sheng et al. 2001).

Durch die Stratifizierung der Proben anhand des LAC-Screen-Ratio-Ergebnisses zeigte die ROC-Analyse für die TG-Parameter eine Erhöhung der Spezifität der Identifizierung von Patienten mit vorangegangener Thrombose. Für die Patienten mit positiver LAC-Screen-Ratio zeigte die ROC-Analyse hohe  $AUC_{ROC}$ -Werte für alle untersuchten TG-Parameter.

Unter den vier Fällen, die aufgrund der gehemmten Thrombingenerierung nicht in die ROC-Analyse einfließen, waren drei Patienten mit einer Thrombose in der Vorgeschichte. Somit könnte man spekulieren, dass zwischen der Hemmung der Thrombingenerierung und einer vorangegangenen Thrombose ein starker Zusammenhang besteht. Es gibt Untersuchungen, die ein erhöhtes Thromboserisiko mit einer erhöhten Thrombingenerierung in Verbindung bringen (Eichinger et al. 2008, Hron et al. 2006), die jedoch nicht durch Lupus-Antikoagulanzen bedingt war. In der vorliegenden Untersuchung wurde eine verringerte Thrombingenerierung festgestellt und dies wurde vorwiegend in Proben mit pathologischen dRVVT-Ergebnissen beobachtet.

Als ein möglicher Mechanismus der Thromboseinduktion durch die Lupus-Antikoagulanzen wurde eine erworbene APC-Resistenz diskutiert (Saenz et al. 2011, Male et al. 2001, Zuily et al. 2012). Bei der hereditären APC-Resistenz (Faktor-V-Leiden-Mutation) ist die Thrombingenerierung nicht verändert (Hron et al. 2006) und eine Änderung der TG-Parameter wird erst nach Zugabe von APC beobachtet (Hezard et al. 2006, Chaireti et al. 2009). Bei einer erworbenen APC-Resistenz wurde eine Verlängerung von *lag time* und eine verringerte Thrombinbildung (Liestøl et al. 2007) auch ohne Zugabe von APC beschrieben. Es wurde vermutet, dass eine erworbene LA-induzierte APC-Resistenz ein wichtiger Mechanismus der LA-assoziierten Thromboseneigung ist (Regnault et al. 2003, Arachchillage et al. 2014).

Ein Zusammenhang zwischen  $\alpha\beta_2$ GPI-AK und aCL-AK und einer Verlängerung von *lag time* oder einer reduzierten Thrombinbildung ist umstritten (Devreese et al. 2009, Sheng et al. 2001, Hanly und Smith 2000, Ninivaggi et al. 2012). Unter den untersuchten Proben war die Zahl der AK-positiven Fälle klein und es wurden keine signifikanten Veränderungen der TG-Parameter beobachtet. Ninivaggi et al. beschrieben, dass eine Inkubation mit Phospholipiden notwendig ist, um eine Konformationsänderung von  $\beta_2$ GPI zu bewirken, die zur Veränderung der TG-Parameter führt (Ninivaggi

et al. 2012). Die verschiedenen Testverfahren und möglicherweise eine nicht ausreichende Nachweisbarkeit von  $\alpha\beta_2$ GPI-AK bei LA-positiven Patienten, die auf die unzureichende Sensitivität der derzeit erhältlichen Test-Kits zurückgeführt wird, können die unterschiedlichen Ergebnisse erklären (Devreese et al. 2009). Die Untersuchung der Auswirkungen von  $\alpha\beta_2$ GPI-AK war jedoch nicht der Schwerpunkt dieser Arbeit.

Durch die Stratifizierung der Proben nach dem Ergebnis der LAC-Screen-Ratio ergab die ROC-Analyse eine hohe Trennschärfe der TG-Parameter in Bezug auf vorangegangene Thrombose. Die Erweiterung der etablierten Diagnostik um die Messung der Thrombingenerierung und womöglich um die Untersuchung auf erworbene APC-Resistenz könnte eine bessere Risikostratifizierung ermöglichen.

Die stärkste Einschränkung ist das retrospektive Design der Untersuchung. Das Risiko einer vorangegangenen Thrombose spiegelt nicht unbedingt das Risiko einer künftigen Thrombose wider. Dieser Aspekt kann nur durch eine prospektive Studie in einer größeren Patientengruppe untersucht werden.

Die fluorometrische Messung der Thrombingenerierung erfolgte automatisiert. Die Pipettierung erfolgte manuell, was trotz einer besonderen Sorgfalt eine zusätzliche Fehlerquelle darstellt. Bei einem regulären Einsatz im klinischen Alltag ist eine Automatisierung der Pipettierung jedoch möglich.

Durch wiederholte Messungen einer Qualitätskontrollprobe bestimmte Messungenauigkeit lag für unterschiedliche TG-Parameter zwischen 6% und 14,6%. Eine methodenbedingte Ungenauigkeit der Messergebnisse ist somit nicht auszuschließen. Für die klinische Anwendung kann die Messung der Thrombingenerierung jedoch als ausreichend erachtet werden.

Des Weiteren wurden nicht alle, sondern nur ein Teil der LA-negativen Proben in die Untersuchung einbezogen und der Kontrollgruppe zugeordnet. Daher waren die positiven Proben überrepräsentiert, was zur Verzerrung des Ergebnisses geführt haben könnte.

In die Studie wurden nicht nur Proben von Patienten mit einem diagnostisch nachgewiesenen Antiphospholipidsyndrom einbezogen, sondern Proben mit abnormen Ergebnissen in der initialen Testung. Möglicherweise wären bei einigen Patienten die Ergebnisse des Thrombophiliescreenings innerhalb der folgenden zwölf Wochen nicht mehr pathologisch gewesen. Allerdings beeinflusst es nicht unbedingt die Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, weil die Analyse sich nicht auf die APS-Diagnose, sondern auf die quantitativen Veränderungen in den Gerinnungstests bezog.

Daher sollte die Thrombingenerierung in einem größeren Patientenkollektiv in Bezug auf die Rolle bei der LA-Diagnostik beurteilt werden.

## 6 Schlussfolgerungen

Es ist bekannt, dass Patienten mit APS an rezidivierenden Thromboembolien leiden. Unter der Annahme, dass ein Patient mit einem bereits stattgefundenen thrombotischen Ereignis ein höheres Risiko für ein erneutes Ereignis hat, ist es sinnvoll zu versuchen, diesem durch eine Antikoagulation entgegenzuwirken. Da jede medikamentöse therapeutische Maßnahme das Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen in sich birgt, ist es erstrebenswert, die Entscheidung für eine verlängerte Antikoagulation sorgfältig abzuwägen. Es erfordert jedoch ein Mindestmaß an Anhaltspunkten, die in die Entscheidungsfindung einbezogen werden.

Aus therapeutischer Sicht wäre ein prädiktiver Marker für ein Thromboserezidiv von einem hohen Nutzen. Zusätzlich zu den bereits im Rahmen der LA-Diagnostik etablierten Untersuchungen der plasmatischen Gerinnung kann die Messung der Thrombingenerierung möglicherweise die Abschätzung der Thromboseneigung deutlich verbessern.

In der vorliegenden retrospektiven Untersuchung zeigte sich, dass einzelne Parameter der Thrombingenerierung bei Patienten mit Thrombose in der Vorgeschichte sich von denen der Patienten ohne Thrombose signifikant unterschieden. Diese Unterschiede traten vor allem in Patientenproben mit einem auffälligen Ergebnis der Screeninguntersuchung auf Lupusantikoagulans (dRVVT) auf. Unter den untersuchten Parametern zeigte sich die Fläche unter der Kurve (AUC) bei Verwendung eines phospholipidreichen Reagenzes als bester Prädiktor einer Thrombose.

Die Ergebnisse der Untersuchung lassen spekulieren, dass die Messung der Thrombingenerierung zusätzlich zur Screeninguntersuchung auf Lupusantikoagulans (dRVVT) eine bessere Diskriminierung zwischen Patientengruppen mit einem hohen und einem niedrigen Risiko für eine erneute Thrombose erlaubt.

Daher sind prospektive klinische Studien mit größeren Patientenkollektiven zur Klärung der Rolle der Thrombingenerierung bei der LA-Diagnostik unbedingt erforderlich.

## Literaturverzeichnis

- Akimoto T, Kobayashi S, Tamura N, Ohsawa T, Kawano T, Tanaka M, Hashimoto H. 2005. Risk factors for recurrent thrombosis: prospective study of a cohort of Japanese systemic lupus erythematosus. *Angiology*, 56(5):601–609.
- Alarcon-Segovia D, Cabral AR. 1996. The concept and classification of antiphospholipid/cofactor syndromes. *Lupus*, 5:364–367.
- Alarcon-Segovia D, Deleze M, Oria CV, Sanchez-Guerrero J, Gomez-Pacheco L, Cabiades J, Fernandez L, Ponce de Leon S. 1989. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)*, 68:353–365.
- Alegre VA, Gastineau DA, Winkelmann RK. 1989. Skin lesions associated with circulating lupus anticoagulant. *British Journal of Dermatology*, 120(3):419–429.
- Arachchillage DR, Efthymiou M, Mackie IJ, Lawrie AS, Machin SJ, Cohen H. 2014. Anti-protein C antibodies are associated with resistance to endogenous protein C activation and a severe thrombotic phenotype in antiphospholipid syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(11):1801–1809.
- Asherson RA, Frances C, Iaccarino L, Khamashta MA, Malacarne F, Piette JC, Tincani A, Doria A. 2006. The antiphospholipid antibody syndrome: diagnosis, skin manifestations and current therapy. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 24:46–51.
- Backhaus K. 2006. *Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung*. Berlin: Springer.
- Barthels M. 2008. Gerinnungsdiagnostik. *Hämostaseologie*, 28(5):320–334.
- Berntorp E, Salvagno GL. 2008. Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 34(7):670–682.
- Blank M, Faden D, Tincani A, Kopolovic J, Goldberg I, Gilburd B, Allegri F, Balestrieri G, Valesini G, Shoenfeld Y. 1994. Immunization with anticardiolipin cofactor (beta-2-glycoprotein I) induces experimental antiphospholipid syndrome in naive mice. *Journal of Autoimmunity*, 7(4):441–455.
- Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. 1995. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thrombosis and Haemostasis*, 74(4):1185–1190.
- Caronti B, Calderaro C, Alessandri C, Conti F, Tinghino R, Palladini G, Valesini G. 1999.

- Beta2-glycoprotein I (beta2-GPI) mRNA is expressed by several cell types involved in anti-phospholipid syndrome-related tissue damage. *Clinical & Experimental Immunology*, 115:214–219.
- Cervera R, Boffa MC, Khamashta MA, Hughes GR. 2009a. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. *Lupus*, 18:889–893.
- Cervera R, Bucciarelli S, Plasín MA, Gómez-Puerta JA, Plaza J, Pons-Estel G, Shoenfeld Y, Ingelmo M, Espinos G, Cervera R, Font J, Piette JC, Bucciarelli S, Espinosa G, Asherson RA, Shoenfeld Y, Amigo MC, Barile-Fabris L, Boffa JJ, Boffa MC, Chavez I, Chapman J, Davidson C, Denes AE, Derksen RH, Díaz Coto JF, Disdier P, Egan RM, Ehrenfeld M, Enriquez R, Falcini F, Fang LS, García-Carrasco M, Grandone JT, Gurjal A, Hayem G, Hughes GR, Inam S, Kant KS, Khamashta MA, Kitchens CS, Kupfermink MJ, de Larranaga G, Levy RA, Lockshin MD, Lui SF, Maddison PJ, Mekori YA, Miyamae T, Moore J, Moutsopoulos HM, Muñoz-Rodríguez FJ, Musial J, Nakajima A, Neuwelt MC, Parke A, Praprotnik S, Roca B, Rojas-Rodríguez J, Roldan R, Sawitzke AD, Schaar CG, Sipek-Dolnicar A, Spyropoulos AC, Sinico R, Stojanovich L, Tan D, Tektonidou M, Vasconcelos C, Veloso MP, Wislowska M. 2009b. Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS): descriptive analysis of a series of 280 patients from the „CAPS Registry“. *Journal of Autoimmunity*, 32:240–245.
- Cervera R, Cervera R, Bucciarelli S, Espinosa G, Erkan D, Shoenfeld Y, Asherson RA, Amigo MC, Barile-Fabris L, Boffa JJ, Boffa MC, Chavez I, Chapman J, Davidson C, Denes AE, Derksen RH, Coto JF, Disdier P, Egan RM, Ehrenfeld M, Enriquez R, Falcini F, Fang LS, García-Carrasco M, Grandone JT, Gurjal A, Hayem G, Hughes GR, Inam S, Kant KS, Khamashta MA, Kitchens CS, Kupfermink MJ, de Larranaga G, Levy RA, Lockshin MD, Lui SF, Maddison PJ, Mekori YA, Miyamae T, Moore J, Moutsopoulos HM, Muñoz-Rodríguez FJ, Musial J, Nakajima A, Neuwelt MC, Parke A, Piette JC, Praprotnik S, Roca B, Rojas-Rodríguez J, Roldan R, Sawitzke AD, Schaar CG, Shoenfeld Y, Sipek-Dolnicar A, Spyropoulos AC, Sinico R, Stojanovich L, Tan D, Tektonidou M, Veloso MP, Wislowska M. 2010. Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS): update from the „CAPS Registry“. *Lupus*, 19:412–418.
- Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, Jacobsen S, Lakos G, Tincani A, Kontopoulou-Griva I, Galeazzi M, Meroni PL, Derksen RH, de Groot PG, Gromnica-Ihle E, Baleva M, Mosca M, Bombardieri S, Houssiau F, Gris JC, Quere I, Hachulla E, Vasconcelos C, Roch B, Fernández-Nebro A, Boffa MC, Hughes GR, Ingelmo M. 2002. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis & Rheumatism*, 46:1019–1027.



- Chaireti R, Jennersjo C, Lindahl TL. 2009. Thrombin generation and D-dimer concentrations in a patient cohort investigated for venous thromboembolism. Relations to venous thrombosis, factor V Leiden and prothrombin G20210A. The LIST study. *Thrombosis Research*, 124(2):178–184.
- Chantarangkul V, Tripodi A, Arbini A, Mannucci PM. 1992. Silica clotting time (SCT) as a screening and confirmatory test for detection of the lupus anticoagulants. *Thrombosis Research*, 67(4):355–365.
- Instrumentation Laboratory Company. 2002. IL Test™ MixConLA - Coagulation, R1 [Packungsbeilage].
- Instrumentation Laboratory Company. 2005. HemosIL™ LAC Screen - 0020008000 / LAC Confirm - 0020008200, 301233, R4 [Packungsbeilage].
- Conti F, Sorice M, Circella A, Alessandri C, Pittoni V, Caronti B, Calderaro C, Griggi T, Misasi R, Valesini G. 2003. Beta-2-glycoprotein I expression on monocytes is increased in anti-phospholipid antibody syndrome and correlates with tissue factor expression. *Clinical & Experimental Immunology*, 132:509–516.
- Day JR, O'Hara PJ, Grant FJ, Lofton-Day C, Berkaw MN, Werner P, Arnaud P. 1992. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding human apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I). *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, 21:256–263.
- Devreese K, Peerlinck K, Arnout J, Hoylaerts MF. 2009. Laboratory detection of the antiphospholipid syndrome via calibrated automated thrombography. *Thrombosis and Haemostasis*, 101(1):185–196.
- Devreese K, Peerlinck K, Hoylaerts MF. 2011. Diagnostic test combinations associated with thrombosis in lupus anticoagulant positive patients. *Thrombosis and Haemostasis*, 105(4):736–738.
- Eichinger S, Hron G, Kollars M, Kyrle PA. 2008. Prediction of recurrent venous thromboembolism by endogenous thrombin potential and D-dimer. *Clinical Chemistry*, 54(12):2042–2048.
- Endler G, Marsik C, Jilma B, Schickbauer T, Vormittag R, Wagner O, Mannhalter C, Rumpold H, Pabinger I. 2006. Anti-cardiolipin antibodies and overall survival in a large cohort: preliminary report. *Clinical Chemistry*, 52:1040–1044.
- Erdogan D, Goren MT, Diz-Kucukkaya R, Inanc M. 2005. Assessment of cardiac structure and left atrial appendage functions in primary antiphospholipid syndrome: a transesophageal echocardiographic study. *Stroke*, 36:592–596.
- Espinosa G, Cervera R, Font J, Asherson RA. 2002. The lung in the antiphospholipid syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61:195–198.
- Forastiero RR, Martinuzzo ME, Kordich LC, Carreras LO. 1996. Reactivity to beta 2 glycoprotein I clearly differentiates anticardiolipin antibodies from antiphospholipid

- syndrome and syphilis. *Thrombosis and Haemostasis*, 75:717–720.
- Frances C, Niang S, Laffitte E, Pelletier FI, Costedoat N, Piette JC. 2005. Dermatologic manifestations of the antiphospholipid syndrome: two hundred consecutive cases. *Arthritis & Rheumatism*, 52(6):1785–1793.
- Fromm S. 2005. Binäre logistische Regressionsanalyse. *Bamberger Beiträge zur empirischen Sozialforschung*. 11. Berlin: Gerhard Schulze und Leila Akremi.
- Galli M. 2004. Antiphospholipid antibodies and thrombosis: do test patterns identify the patients' risk? *Thrombosis Research*, 114(5-6):597–601.
- Galli M, Dlott J, Norbis F, Ruggeri L, Cler L, Triplett DA, Barbui T. 2000. Lupus anticoagulants and thrombosis: clinical association of different coagulation and immunologic tests. *Thrombosis and Haemostasis*, 84(6):1012–1016.
- Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. 2003. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Blood*, 101(5):1827–1832.
- Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. 1987. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 46(1):1–6.
- Green DM, Swets JA. 1974. *Signal Detection Theory and Psychophysics*. New York: John Wiley & Sons Canada, Limited.
- Gressner AM, Arndt T. 2005. *Springer Lexikon Klinische Chemie - Medizinische Labordiagnostik von A bis Z*. Erste Aufl. Berlin: Springer.
- Hanly JG, Smith SA. 2000. Anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies, in vitro thrombin generation, and the antiphospholipid syndrome. *The Journal of Rheumatology*, 27(9):2152–2159.
- Hassell KL, Kressin DC, Neumann A, Ellison R, Marlar RA. 1994. Correlation of antiphospholipid antibodies and protein S deficiency with thrombosis in HIV-infected men. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 5:455–462.
- Hezard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, Nguyen P. 2006. Utility of thrombin-generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency. *Clinical Chemistry*, 52(4):665–670.
- Horstman LL, Jy W, Bidot CJ, Ahn YS, Kelley RE, Zivadinov R, Maghzi AH, Etemadifar M, Mousavi SA, Minagar A. 2009. Antiphospholipid antibodies: paradigm in transition. *Journal of Neuroinflammation*, 6:3.
- Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. 2006. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *The Journal of the American Medical Association*, 296(4):397–402.
- Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. 1992. A phospholipid-beta 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in

- autoimmune disease but not with infection. *Lupus*, 1:75–81.
- Landenberg P, Landenberg C, Scholmerich J, Lackner KJ. 2001. Das Antiphospholipidsyndrom. Pathogenese, molekulare Grundlagen und klinische Aspekte. *Medizinische Klinik (München)*, 96:331–342.
- Lasko TA, Bhagwat JG, Zou KH, Ohno-Machado L. 2005. The use of receiver operating characteristic curves in biomedical informatics. *Journal of Biomedical Informatics*, 38(5):404–415.
- Levy RA, Jesus GR, Jesus NR. 2010. Obstetric antiphospholipid syndrome: still a challenge. *Lupus*, 19:457–459.
- Liestøl S, Sandset PM, Jacobsen EM, Mowinckel MC, Wisløff F. 2007. Decreased anticoagulant response to tissue factor pathway inhibitor type 1 in plasmas from patients with lupus anticoagulants. *British Journal of Haematology*, 136(1):131–137.
- Loizou S, Singh S, Wypkema E, Asherson RA. 2003. Anticardiolipin, anti-beta(2)-glycoprotein I and antiprothrombin antibodies in black South African patients with infectious disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62:1106–1111.
- Luxembourg B, Krause M, Lindhoff-Last E. 2007. Basiswissen Gerinnungslabor. *Deutsches Ärzteblatt*, 104(21):A1489–A1498.
- Lövgren A. 2013. Recombinant snake venom prothrombin activators. *Bioengineered*, 4(3):153–157.
- Male C, Mitchell L, Julian J, Vegh P, Joshua P, Adams M, David M, Andrew ME. 2001. Acquired activated protein C resistance is associated with lupus anticoagulants and thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Blood*, 97(4):844–849.
- Mann HB, Whitney DR. 1947. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18(1):50–60.
- Mansmann U. 2007. Der diagnostische Test. *Medizinische Biometrie (L5) [Vorlesung]*. Berlin: Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie.
- Matsuura E, Shen L, Matsunami Y, Quan N, Makarova M, Geske FJ, Boisen M, Yasuda S, Kobayashi K, Lopez LR. 2010. Pathophysiology of beta2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome. *Lupus*, 19:379–384.
- McNeil HP, Chesterman CN, Krilis SA. 1989. Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulants comprise separate antibody subgroups with different phospholipid binding characteristics. *British Journal of Haematology*, 73:506–513.
- Mitchell K, Kaul M, Clowse ME. 2010. The management of rheumatic diseases in pregnancy. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 39:99–108.

- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyianopoulos PG, Krilis SA. 2006. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4:295–306.
- Mohren M, Daikeler T, Engel A, Guenaydin I, Koetter I. 2004. Diagnose des Antiphospholipid-Syndrom beim antikoagulierten Patient: Was gibt es zu beachten? *Zeitschrift für Rheumatologie*, 63(6):490–494.
- Montalban J, Cervera R, Font J, Ordi J, Vianna J, Haga HJ, Tintore M, Khamashta MA, Hughes GR. 1992. Lack of association between anticardiolipin antibodies and migraine in systemic lupus erythematosus. *Neurology*, 42:681–682.
- Ninivaggi M, Kelchtermans H, Lindhout T, de Laat B. 2012. Conformation of beta2glycoprotein I and its effect on coagulation. *Thrombosis Research*, 130 Suppl 1:S33–36.
- Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, De Groot PG. 2009. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(10):1737–1740.
- Pötzsch B, Madlener K. 2010. Hämostaseologie - Grundlagen, Diagnostik und Therapie, Kap Thrombingenerierung und endogenes Thrombinbildungspotenzial. Berlin Heidelberg: Springer, 873–876.
- Quehenberger P, Wagner O. 2005. Labordiagnostik von Lupushemmstoffen. *Hämostaseologie*, 25:50–54.
- Reber G, Tincani A, Sanmarco M, de Moerloose P, Boffa MC. 2004. Proposals for the measurement of anti-beta2-glycoprotein I antibodies. Standardization group of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2:1860–1862.
- Regnault V, Beguin S, Wahl D, de Maistre E, Coenraad Hemker H, Lecompte T. 2003. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thrombosis and Haemostasis*, 89(2):208–212.
- Rehak M, Müller M, Scholz M, Wiercinska J, Niederwieser D, Wiedemann P. 2009. Antiphospholipidsyndrom und retinale venöse Verschlüsse. Metaanalyse publizierter Studien. *Der Ophthalmologe*, 106:427–434.
- Rodrigues CE, Carvalho JF, Shoenfeld Y. 2010. Neurological manifestations of antiphospholipid syndrome. *European Journal of Clinical Investigation*.
- Roldan CA, Shively BK, Lau CC, Gurule FT, Smith EA, Crawford MH. 1992. Systemic lupus erythematosus valve disease by transesophageal echocardiography

- and the role of antiphospholipid antibodies. *The Journal of the American College of Cardiology*, 20:1127–1134.
- Ruiz-Irastorza G, Cuadrado MJ, Ruiz-Arruza I, Brey R, Crowther M, Derksen R, Erkan D, Krilis S, Machin S, Pengo V, Pierangeli S, Tektonidou M, Khamashta M. 2011. Evidence-based recommendations for the prevention and long-term management of thrombosis in antiphospholipid antibody-positive patients: report of a task force at the 13th International Congress on antiphospholipid antibodies. *Lupus*, 20(2):206–218.
- Ruiz-Irastorza G, Hunt BJ, Khamashta MA. 2007. A systematic review of secondary thromboprophylaxis in patients with antiphospholipid antibodies. *Arthritis & Rheumatism*, 57(8):1487–1495.
- Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA. 2006. Systemischer Lupus erythematosus und Antiphospholipidsyndrom in der Schwangerschaft. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 65:192–194.
- Saenz AJ, Johnson NV, Van Cott EM. 2011. Acquired activated protein C resistance caused by lupus anticoagulants. *American Journal of Clinical Pathology*, 136(3):344–349.
- Schulman S, Svenungsson E, Granqvist S. 1998. Anticardiolipin antibodies predict early recurrence of thromboembolism and death among patients with venous thromboembolism following anticoagulant therapy. Duration of Anticoagulation Study Group. *The American Journal of Medicine*, 104(4):332–338.
- Schumacher M, Schulgen-Kristiansen G. 2002. *Methodik Klinischer Studien - Methodische Grundlagen der Planung, Durchführung und Auswertung*. Berlin: Springer.
- Sheng Y, Hanly JG, Reddel SW, Kouts S, Guerin J, Koike T, Ichikawa K, Sturgess A, Krilis SA. 2001. Detection of 'antiphospholipid' antibodies: a single chromogenic assay of thrombin generation sensitively detects lupus anticoagulants, anticardiolipin antibodies, plus antibodies binding beta(2)-glycoprotein I and prothrombin. *Clinical & Experimental Immunology*, 124(3):502–508.
- Shi W, Krilis SA, Chong BH, Gordon S, Chesterman CN. 1990. Prevalence of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in a healthy population. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, 20:231–236.
- Specker C. 2007a. Antiphospholipidsyndrom. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 66:41–50.
- Specker C. 2007b. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, Qualitätssicherung in der Rheumatologie, Kap Medikamentöse Therapie. Antiphospholipidsyndrom. Zweite Aufl. Leipzig: Steinkopff, 370–373.
- Speijer H, Govers-Riemslog JW, Zwaal RF, Rosing J. 1986. Prothrombin activation by an activator from the venom of *Oxyuranus scutellatus* (Taipan snake). *Journal of Biological Chemistry*, 261(28):13258–13267.

- Stojanovich L. 2006. Pulmonary manifestations in antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity Reviews*, 5:344–348.
- Suvajac G, Stojanovich L, Milenkovich S. 2007. Ocular manifestations in antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity Reviews*, 6:409–414.
- Swadzba J, Iwaniec T, Pulka M, De Laat B, De Groot PG, Musial J. 2011. Lupus anticoagulant: performance of the tests as recommended by the latest ISTH guidelines. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(9):1776–1783.
- Takeya H, Mori T, Gabazza EC, Kuroda K, Deguchi H, Matsuura E, Ichikawa K, Koike T, Suzuki K. 1997. Anti-beta2-glycoprotein I (beta2GPI) monoclonal antibodies with lupus anticoagulant-like activity enhance the beta2GPI binding to phospholipids. *Journal of Clinical Investigation*, 99:2260–2268.
- Tans G, van Hylckama Vlieg A, Thomassen MC, Curvers J, Bertina RM, Rosling J, Rosendaal FR. 2003. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test predicts for venous thrombosis in men and women. *British Journal of Haematology*, 122(3):465–470.
- Technoclone Ltd. 2006. TECHNOTHROMBIN™ TGA, 001D.007 [Packungsbeilage].
- Tenedios F, Erkan D, Lockshin MD. 2005. Cardiac involvement in the antiphospholipid syndrome. *Lupus*, 14:691–696.
- Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. 1986. The use of the dilute Russell viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood*, 68(4):869–874.
- Tincani A, Bazzani C, Zingarelli S, Lojacono A. 2008. Lupus and the antiphospholipid syndrome in pregnancy and obstetrics: clinical characteristics, diagnosis, pathogenesis, and treatment. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 34:267–273.
- Triplett DA. 2000. Use of the dilute Russell viper venom time (dRVVT): its importance and pitfalls. *Journal of Autoimmunity*, 15(2):173–178.
- Tripodi A. 2007. Laboratory testing for lupus anticoagulants: a review of issues affecting results. *Clinical Chemistry*, 53(9):1629–1635.
- Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, Negri B, Galli M, Mannucci PM. 2001. Laboratory control of oral anticoagulant treatment by the INR system in patients with the antiphospholipid syndrome and lupus anticoagulant. Results of a collaborative study involving nine commercial thromboplastins. *British Journal of Haematology*, 115(3):672–678.
- Turiel M, Muzzupappa S, Gottardi B, Crema C, Sarzi-Puttini P, Rossi E. 2000. Evaluation of cardiac abnormalities and embolic sources in primary antiphospholipid syndrome by transesophageal echocardiography. *Lupus*, 9:406–412.
- Turiel M, Sarzi-Puttini P, Peretti R, Bonizzato S, Muzzupappa S, Atzeni F, Rossi E, Doria A. 2005. Five-year follow-up by transesophageal echocardiographic studies in primary antiphospholipid syndrome. *The American Journal of Cardiology*, 96:574–

579.

- Uthman I, Khamashta M. 2007. The abdominal manifestations of the antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 46:1641–1647.
- Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Font J, Cervera R, Lopez-Soto A, Tolosa C, Franz J, Selva A, Ingelmo M. 1994. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European Multicenter Study of 114 patients. *The American journal of medicine*, 96:3–9.
- Vila P, Hernandez MC, Lopez-Fernandez MF, Batlle J. 1994. Prevalence, follow-up and clinical significance of the anticardiolipin antibodies in normal subjects. *Thrombosis and Haemostasis*, 72:209–213.
- Visvanathan S, Geczy CL, Harmer JA, McNeil HP. 2000. Monocyte tissue factor induction by activation of beta 2-glycoprotein-I-specific T lymphocytes is associated with thrombosis and fetal loss in patients with antiphospholipid antibodies. *The Journal of Immunology*, 165:2258–2262.
- Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, Brey R, Derksen R, Harris EN, Hughes GR, Triplett DA, Khamashta MA. 1999. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis & Rheumatism*, 42:1309–1311.
- Wisløff F, Jacobsen EM, Liestøl S. 2002. Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Thrombosis Research*, 108:263–271.
- Wong RC. 2004. Consensus guidelines for anticardiolipin antibody testing. *Thrombosis Research*, 114(5-6):559–571.
- Zuily S, Ait Aissa K, Membre A, Regnault V, Lecompte T, Wahl D. 2012. Thrombin generation in antiphospholipid syndrome. *Lupus*, 21(7):758–760.

# Anhang

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Aus der Messung der Thrombingenerierung abgeleitete Parameter (TG-Parameter). . . . .	20
Abb. 2:	Auswahlverfahren von Patientenproben, die in die Untersuchung aufgenommen wurden. . . . .	22
Abb. 3:	Ideale ROC-Kurve mit der Winkelhalbierenden. . . . .	29
Abb. 4:	Vergleich von LAC-Screen-Ratio zwischen Proben mit und ohne Thrombose in der Vorgeschichte. . . . .	32
Abb. 5:	Vergleich zwischen Proben mit und ohne Thrombose in der Vorgeschichte bei Induktion mit $RC_{LOW}$ und $RC_{HIGH}$ bezogen auf <i>lag time</i> . . . . .	33
Abb. 6:	Vergleich zwischen Proben mit und ohne Thrombose in der Vorgeschichte bei Induktion mit $RC_{LOW}$ und $RC_{HIGH}$ bezogen auf <i>time to peak</i> . . . . .	34
Abb. 7:	Vergleich zwischen Proben mit und ohne Thrombose in der Vorgeschichte bei Induktion mit $RC_{LOW}$ und $RC_{HIGH}$ bezogen auf <i>peak height</i> . . . . .	35
Abb. 8:	Vergleich zwischen Proben mit und ohne Thrombose in der Vorgeschichte bei Induktion mit $RC_{LOW}$ und $RC_{HIGH}$ bezogen auf AUC. . . . .	36
Abb. 9:	Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit $RC_{LOW}$ bezogen auf <i>lag time</i> . . . . .	38
Abb. 10:	Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit $RC_{HIGH}$ bezogen auf <i>lag time</i> . . . . .	39



Abb. 11:	Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit $RC_{LOW}$ bezogen auf <i>peak height</i> .	40
Abb. 12:	Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit $RC_{HIGH}$ bezogen auf <i>peak height</i> .	41
Abb. 13:	Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit $RC_{LOW}$ bezogen auf <i>time to peak</i> .	42
Abb. 14:	Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit $RC_{HIGH}$ bezogen auf <i>time to peak</i> .	43
Abb. 15:	Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit $RC_{LOW}$ bezogen auf AUC.	44
Abb. 16:	Vergleich der Untergruppen bei Induktion mit $RC_{HIGH}$ bezogen auf AUC.	45
Abb. 17:	ROC-Kurve bezogen auf AUC bei positiver LAC-Screen-Ratio und Induktion mit $RC_{HIGH}$ .	48
Abb. 18:	Votum der Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena N°2923-09/10.	VI

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Unterteilung der Antigene nach Horstman et al. . . . .	13
Tab. 2:	Vergleichende Übersicht ausgewählter Gerinnungstests. . . . .	18
Tab. 3:	Merkmale der Patienten, deren Proben in die Studie aufgenommen wurden. . . . .	23
Tab. 4:	Messungenauigkeit. . . . .	31
Tab. 5:	Ergebnis der hierarchischen Regressionsanalyse für AUC und Thrombose als abhängige Variable bei Verwendung des RC <sub>HIGH</sub> - Reagenzes. . . . .	46
Tab. 6:	Ergebnis der ROC-Analyse zur Beurteilung der nach LAC-Screen- Ratio vorselektierten TG-Parameter bezogen auf Thrombose in der Vorgeschichte. . . . .	47

## Formelsammlung

$$\text{Mischplasma-Ratio} = \frac{\text{high sensitivity MixCon LA (Mischplasma)}}{\text{low sensitivity MixCon LA (Mischplasma)}} \quad (1)$$

$$\text{Normalplasma-Ratio} = \frac{\text{high sensitivity MixCon LA (Normalplasma)}}{\text{low sensitivity MixCon LA (Normalplasma)}} \quad (2)$$

$$\text{MixCon LA-Ratio} = \frac{\text{Mischplasma-Ratio}}{\text{Normalplasma-Ratio}} \quad (3)$$

$$\text{LAC-Screen-Ratio} = \frac{\text{LAC-Screen (Patientenplasma)}}{\text{LAC-Screen (Normalplasma)}} \quad (4)$$

$$\text{LAC-Confirm-Ratio} = \frac{\text{LAC-Confirm (Patientenplasma)}}{\text{LAC-Confirm (Normalplasma)}} \quad (5)$$

$$\text{Normalisierte LAC-Ratio} = \frac{\text{LAC-Screen-Ratio}}{\text{LAC-Confirm-Ratio}} \quad (6)$$

$$\text{Screen-Ratio} = \frac{\text{SCT-Screen (Patientenplasma)}}{\text{SCT-Screen (Normalplasma)}} \quad (7)$$

$$\text{Confirm-Ratio} = \frac{\text{SCT-Confirm (Patientenplasma)}}{\text{SCT-Confirm (Normalplasma)}} \quad (8)$$

$$\text{Normalisierte SCT-Ratio} = \frac{\text{Screen-Ratio}}{\text{Confirm-Ratio}} \quad (9)$$

$$\text{Rosner-Index} = \frac{\text{KCT (Mischplasma)} - \text{KCT (Normalplasma)}}{\text{KCT (Patientenplasma)}} \quad (10)$$

# **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr Priv.-Doz. Dr. Klas Böer, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Frau Dr. Antje Brandstädt, Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation, Friedrich-Schiller-Universität Jena

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und

dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Leonid Cuznetov

Jena, den 10.01.2016

# Votum der Ethik-Kommission

Eingang IKCL 975	
20. OKT. 2010	
Abteilung:	Bearbeiter:
Vermerk:	



Universitätsklinikum  
Jena

## Ethik-Kommission

Vorsitzende: Prof. Dr. med. Dagmar Barz  
Geschäftsstelle: Dr. phil. Ulrike Skorsetz

Bachstraße 18  
07743 Jena

Telefon 03641 93 37 70  
Telefax 03641 93 37 71

E-Mail: [ethikkommission@med.uni-jena.de](mailto:ethikkommission@med.uni-jena.de)

Jena, 15. Oktober 2010

Universitätsklinikum Jena · Ethik-Kommission · Postfach · 07740 Jena

Dr. K. Böer  
Institut für Klinische Chemie und  
Laboratoriumsdiagnostik  
UKJ

**Bearbeitungsnummer: 2923-09/10**

Sehr geehrter Herr Kollege,

in ihrer Sitzung am 14.10.2010 hat die Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller Universität  
Ihren Antrag

*Untersuchung der Thrombingenerierungskapazität im Plasma von Patienten mit Lupus-  
Antikoagulans*

beraten und erhebt keine ethischen Bedenken.

Wir wünschen Ihnen viel Erfolg!

Mit kollegialem Gruß

Prof. Dr. med. D. Barz  
Vorsitzende der Ethik-Kommission  
(i. V. Prof. Dr. med. E. G. Mall)

Bachstraße 18 · 07743 Jena · Telefon 03641 93 00  
Internet: [www.uniklinikum-jena.de](http://www.uniklinikum-jena.de)  
Gerichtsstand Jena  
Steuernummer 161 / 144 / 02978 · USt.-IdNr. DE 150545777  
Bankverbindung:  
Sparkasse Jena · BLZ 830 530 30 · Konto 221

Universitätsklinikum Jena · Körperschaft des öffentlichen Rechts  
als Teilkörperschaft der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Kaufmännischer Vorstand  
und Sprecher des Klinikumsvorstandes: Rudolf Kruse  
Verwaltungsratsvorsitzender: Prof. Dr. Thomas Deufel  
Medizinischer Vorstand: Prof. Dr. Klaus Hoffken  
Wissenschaftlicher Vorstand: Prof. Dr. Klaus Benndorf

Abbildung 18: Votum der Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena N°2923-09/10.

## **Danksagung**

Ich danke herzlich Herrn Priv.-Doz. Dr. Klas Böer für die Überlassung des Themas, seine hervorragende Betreuung und seine stetig wohlwollende Hilfe.

Außerdem danke ich meiner Familie für die liebevolle Unterstützung.